



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 48/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/61063</p> <p>(43) 国際公開日 1999年12月2日(02.12.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02595</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月19日(19.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/141426 1998年5月22日(22.05.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP) 株式会社 高研(KOKEN CO., LTD.)(JP/JP) 〒161-0033 東京都新宿区下落合3丁目5-18 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 寺田雅昭(TERADA, Masaaki)[JP/JP] 〒177-0053 東京都練馬区関町南2丁目17番14号 Tokyo, (JP) 落谷孝広(OCHIYA, Takahiro)[JP/JP] 〒104-0045 東京都中央区築地5丁目1番1号 国立がんセンター築地宿舎218号室 Tokyo, (JP) 佐野明彦(SANO, Akihiko)[JP/JP] 〒560-0011 大阪府豊中市上野西1丁目7番22号 Osaka, (JP)</p>		<p>久田明彦(HISADA, Akihiko)[JP/JP] 〒272-0023 千葉県市川市南八幡4丁目4番地17-902 Chiba, (JP) 永原俊治(NAGAHARA, Shunji)[JP/JP] 〒577-0843 大阪府東大阪市荒川2丁目15番14号 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 青山 蓓, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: STABLE GENE PREPARATIONS</p> <p>(54)発明の名称 安定な遺伝子製剤</p> <p>(57) Abstract Preparations for gene therapy capable of sustaining high stability during the production process and storage. These gene preparations contain at least one saccharide and/or at least one non-hydrophobic amino acid and/or at least one organic acid having two or more carboxyl groups (excluding amino acids), or collagen or gelatin and at least one amino acid.</p>		

# (57)要約

遺伝子治療用製剤の製造および保存時における安定性を保持させることを目的とする。

少なくとも1つの糖類および/または少なくとも1つの非疎水性アミノ酸類および/または少なくとも1つのカルボキシル基を2個以上有する有機酸類(アミノ酸を除く)、あるいはコラーゲンまたはゼラチンおよび少なくとも1つのアミノ酸類を遺伝子製剤に含ませる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストラリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE ギルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	HR クロアチア	MK マケドニア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HU ハンガリー	ML マリ	TR トルコ
CF 中央アフリカ	ID インドネシア	MN モンゴル	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	IE アイルランド	MR モリタニア	UA ウクライナ
CH スイス	IL イスラエル	MW マラウイ	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IN インド	MX メキシコ	US 米国
CM カメルーン	IS アイスランド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IT イタリア	NL オランダ	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	JP 日本	NO ノールウェー	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	KE ケニア	NZ ニュー・ジージーランド	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KG キルギスタン	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KR 韓国	RO ルーマニア	
DK デンマーク			

## 明 細 書

## 安定な遺伝子製剤

5      技術分野

本発明は遺伝子治療に使用される安定な遺伝子製剤に関する。さらに詳細には、本発明は製造工程中および組成物の保存安定性が良好な遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターを含有する製剤に関する。

10     背景技術

近年、疾病、特に遺伝病の治療あるいは予防を目的として遺伝子治療が試験的に臨床応用されるようになってきている。遺伝子治療に関する研究の初期においては、細胞に導入される遺伝子の導入効率が高いことを主たる理由としてウイルスをベクターとして用いる手法が専ら研究されてきた。しかし、自己翻訳能力を有する  
15     プラスミドDNA (pDNA) を動物の筋肉内に直接投与することで遺伝情報を発現できることが見いだされて以来、pDNAがウイルスベクターに比べて安全性が高く、また工業的に生産しやすいため、pDNAを用いる遺伝子治療法が盛んに研究されるようになってきている。

pDNAを用いる遺伝子治療の基礎研究における現在の最大の関心事は、pDNAの細胞への導入効率の向上と遺伝情報発現期間の延長である。pDNAの細胞への導入効率の向上を目的としては、pDNAをカチオン性のリポソームに封入する方法やポリマーと複合体を形成させる方法が報告されている。また、遺伝情報発現期間を延長することを目的としては、生体との親和性が高いコラーゲン (特開平9-  
20     71542) あるいはポリエチレンビニル酢酸 (Journal of Controlled Release 47, 123, (1997)) を担体として用いた徐放性製剤に関する報告がなされている。これらの目的が解決できたとしても、遺伝子を含有している遺伝子製剤自体が一定の高品質を保持でき、安定かつ経済的に供給できなければ、実際には、遺伝子治療を広く普及させることはできない。

遺伝子製剤における有効成分たる遺伝子の生物活性を製剤の製造工程あるいは

保存中に安定に保持させることは重要である。閉環状のpDNAを制限酵素で切断し、それを筋肉内に投与すると遺伝情報の発現が閉環状のpDNAを投与した場合の10%程度に低下することが知られている。よって、遺伝子の生物活性保持のためにpDNAの一次構造を製造工程中あるいは様々な条件が予想される保存中に保持させることが重要となる。

先述の基礎研究においてもpDNAの保存時の安定性に言及した報告が一部にあるが(Proceedings of National Academy of Sciences of the USA, 93, 7305 (1996))、遺伝子製剤の製造あるいは製剤の安定性について系統的な検討はこれまで殆ど行われていない。後述の試験例に示すように、pDNAを単独で含有する、またはpDNAの導入効率を高めるための化合物もしくは遺伝子発現期間を延長するための化合物を添加した遺伝子調製物を、製剤化工程で一般に用いられる凍結乾燥条件に曝すと、あるいは品質が安定に保持されるべき保存状態に曝すと、有効成分であるpDNAは分解を受け、生物活性が著しく損なわれてしまう。

#### 15 発明の開示

本発明者らは、安定な遺伝子製剤を得ることを目的として鋭意研究を重ねた結果、pDNAを含有する溶液中に糖類および/または非疎水性アミノ酸類および/またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類(アミノ酸類を除く)を添加した場合、またはコラーゲンまたはゼラチンを含有するときにはアミノ酸類を添加した場合、溶液状態での保存中および/または当該溶液を凍結乾燥する工程中および/または当該溶液の乾燥品の保存中でのpDNAの分解が大きく抑えられることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

本発明は1つの態様として、所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターと、少なくとも1つの糖類および/または少なくとも1つの非疎水性アミノ酸類および/または少なくとも1つのカルボキシル基を2個以上有する有機酸類(アミノ酸類を除く)とを含む安定な遺伝子製剤に関する。

糖類は具体的には単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖またはそれらの糖アルコールであり、より具体的にはグルコース、ガラクトース、フルクトース、シュクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース、ソルビトールまたはマンニト

ールである。

非疎水性アミノ酸類は具体的にはグルタミン酸、アスパラギン酸またはその塩である。

5 カルボキシル基を2個以上有する有機酸類は具体的にはカルボキシル基を2個もしくは3個有する有機酸またはその塩であり、より具体的にはクエン酸または酒石酸である。

所望の遺伝子を組み込んだベクターは具体的にはプラスミドDNAである。

10 本発明の遺伝子製剤は、細胞への遺伝子導入を促進する物質、または医学的に許容される添加剤をさらに含んでもよい。細胞への遺伝子導入を促進する物質としてはカチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたは疎水性ポリマーがある。医学的に許容される添加剤としては生体親和性材料がある。

本発明遺伝子製剤に含まれる所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターは生体親和性材料に担持されていてもよい。生体親和性材料は具体的にはコラーゲン、ゼラチンまたはそれらの混合物である。

15 本発明には、溶液状態、ゲル状態あるいは懸濁液状態である所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターを含む調製物を乾燥工程、好ましくは凍結乾燥に付することにより得られる本発明遺伝子製剤が包含される。

20 また、本発明には、溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態である遺伝子製剤または溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態の工程を経て製造される遺伝子製剤において、溶液状態、ゲル状態または懸濁液状態における糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類（アミノ酸類を除く）の全体に対する含有量が約1 w/v %以上である本発明遺伝子製剤が包含される。

25 本発明は別の態様として、所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターを含む遺伝子調製物に、少なくとも1つの糖類および/または少なくとも1つの非疎水性アミノ酸類および/または少なくとも1つのカルボキシル基を2個以上有する有機酸類（アミノ酸類を除く）を添加することからなる、遺伝子製剤を安定化する方法に関する。

さらに別の態様として、本発明は本発明の遺伝子製剤を生体に投与することからなる遺伝子治療方法に関する。

本発明は、もう1つの態様として、所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクター、少なくとも1つのアミノ酸類、および生体親和性材料、特にコラーゲンまたはゼラチンを含む安定な遺伝子製剤に関する。かかる遺伝子製剤は、細胞への遺伝子導入を促進する物質、例えばカチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたは疎水性ポリマーをさらに含むことができる。本発明は、所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターが生体親和性材料、特にコラーゲンあるいはゼラチンに担持されていることを特徴とする遺伝子製剤を包含する。

本発明はこの態様においても、溶液状態、ゲル状態あるいは懸濁液状態である所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターを含む調製物を乾燥状態、特に凍結乾燥に付することにより得られる本発明遺伝子製剤を包含する。

また、本発明には、溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態である遺伝子製剤または溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態の工程を経て製造される遺伝子製剤において、溶液状態、ゲル状態または懸濁液状態におけるアミノ酸類の全体に対する含有量が約1 w/v %以上である本発明遺伝子製剤が包含される。

別の態様として、本発明は、所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターと生体親和性材料、特にコラーゲンまたはゼラチンとを含む遺伝子調製物に、少なくとも1つのアミノ酸類を添加することからなる、遺伝子製剤を安定化する方法に関する。

さらに別の態様として、本発明は、上記本発明遺伝子製剤を生体に投与することからなる遺伝子治療方法に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、アミノ酸を含有する遺伝子製剤（実施例1）に含まれるpCAHST-1の一次構造の評価結果を示す電気泳動の写真である。

図2は、糖類を含有する遺伝子製剤（実施例2）に含まれるpCAHST-1の一次構造の評価結果を示す電気泳動の写真である。

図3は、カルボキシル基2個を含む有機酸類およびアミノ酸を含有する遺伝子製剤（実施例3）に含まれるpCAHST-1の一次構造の評価結果を示す電気泳動の写真である。

図4は、糖類および遺伝子導入促進成分を含有する遺伝子製剤（実施例4）に含まれるpCAHST-1の一次構造の評価結果を示す電気泳動の写真である。

図5は、糖類を含有する遺伝子製剤（実施例2）を40℃で保存した後、pCAHST-1の一次構造を評価した結果を示す電気泳動の写真である。

5 図6は、糖類および遺伝子導入促進成分を含有する遺伝子製剤（実施例4）を37℃-4週間保存した後、pCAHST-1の一次構造を評価した結果を示す電気泳動の写真である。

図7は、糖類および遺伝子導入促進成分を含有する溶液状遺伝子製剤（実施例5）を40℃-4週間保存した後、pCAHST-1の一次構造を評価した結果を示す電気泳動の写真である。

10 図8は、コラーゲンを含有するスポンジ状遺伝子製剤（実施例7）に含まれるpCAHST-1の一次構造の評価結果を示す電気泳動の写真である。

図9は、コラーゲンを含有する棒状の遺伝子製剤（実施例8）に含まれるpCAHST-1の一次構造の評価結果を示す電気泳動の写真である。

15 図10は、コラーゲンを含有する棒状の遺伝子製剤（実施例8）における血中のpCAHST-1の検出期間を示すグラフである。

図11は、コラーゲンを含有する棒状の遺伝子製剤（実施例8）における血中のHST-1濃度の経時変化を示すグラフである。

20 図12は、試験例10における投与部位でのHST-1量の経時変化を示すグラフである。

図13は、実施例10における血中の血小板数の経時変化を示すグラフである。

図14は、アミノ酸を含有する遺伝子製剤（実施例9）に含まれるpCAHST-1の凍結乾燥時の安定化度を示すグラフである（試験例11）。

25 図15は、糖類を含有する遺伝子製剤（実施例10）に含まれるpCAHST-1の凍結乾燥時の安定化度を示すグラフである（試験例12）。

図16は、アテロコラーゲンおよびアミノ酸を含有する遺伝子製剤（実施例11）に含まれるpCAHST-1の凍結乾燥時における安定化度を示すグラフである（試験例13）。

図17は、アテロコラーゲンおよび糖類を含有する遺伝子製剤（実施例12）

に含まれるpCAHST-1の凍結乾燥時における安定化度を示すグラフである（試験例14）。

図18は、アミノ酸を含有する遺伝子製剤（実施例9）および糖類を含有する遺伝子製剤（実施例10）を40℃で保存した場合のpCAHST-1の安定化度を示すグラフである（試験例15）。

図19は、アテロコラーゲンおよびアミノ酸を含有する遺伝子製剤（実施例11）およびアテロコラーゲンおよび糖類を含有する遺伝子製剤（実施例12）を40℃で保存した場合のpCAHST-1の安定化度を示すグラフである（試験例16）。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

上記のように、本発明の要旨は、所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターと少なくとも1つの糖類および／または少なくとも1つの非疎水性アミノ酸類および／または少なくとも1つのカルボキシル基を2個以上有する有機酸類とを含む安定な遺伝子製剤、ならびに所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクター、コラーゲンまたはゼラチンおよび少なくとも1つのアミノ酸類を含む安定な遺伝子製剤である。本発明製剤は別の局面では、これら糖類、非疎水性アミノ酸類および／または有機酸類を含む、あるいはコラーゲンまたはゼラチンおよびアミノ酸類を含む、含有される遺伝子またはベクターの安定化（分解抑制作用）増強製剤である。

20 「所望の遺伝子」としては、遺伝子治療が可能な遺伝子であればいずれでもよい。ここに、遺伝子治療とは、遺伝子を用いて行われる治療を意味する。例えば、遺伝子治療時に発現が要求されるタンパク質の遺伝子情報をコードする遺伝子、細胞内で特定のDNAやRNAと対合し遺伝子の発現を抑制するアンチセンス配列が挙げられる。アンチセンス配列は、ベクター等に組み込まれることなく使用することができ

25 「所望の遺伝子を組み込んだベクター」としては、細胞内に導入されたとき、コードした遺伝情報を細胞内で発現するように構成された形態が好ましく、プロモーター等、目的遺伝子の発現に必要な要素を含有する、あるいは染色体への組み込みを可能とする要素を含有するベクター、例えばpDNAが挙げられる。



本発明の遺伝子製剤中には、別個の所望の遺伝子を組み込んだ数種類のベクターが同時に存在してもよい。また、一つのベクターには複数の遺伝情報がコードされていてもよい。遺伝子製剤中に含有されるベクターの量に特に制限はない。

5 遺伝子治療時に発現が要求されるタンパク質をコードする遺伝子には遺伝病の処置に用いられ得る遺伝子、例えばアデノシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ等の酵素類、GM-CSF、IL-2等のサイトカイン類、または繊維芽細胞増殖因子HST-1 (FGF4) をコードする遺伝子が挙げられるがこれに限られるものではない。また、  
10 遺伝子治療時に発現が要求される別のタンパク質をコードする遺伝子として、発現されるタンパク質あるいはペプチドが抗原として免疫を誘導し、感染症もしくは腫瘍の予防または治療を行うことを目的とする遺伝子、即ち上記の抗原となり得るタンパク質あるいはペプチドをコードする遺伝子、例えばインフルエンザウイルスの表面タンパク質であるHAやNAまたは核タンパク質であるNPの各タンパク質、C型肝炎ウイルスのE2やNS 1タンパク質、B型肝炎ウイルスのHBs抗原タンパク質、A型肝炎ウイルスのカプシドタンパク質であるVP 1やVP 3、あるいはカプシド様タンパク質、デングウイルスのEgpタンパク質、RSウイルスのFあるいはG  
15 タンパク質、狂犬病ウイルスの構造タンパク質であるGやNタンパク質、ヘルペスウイルスのgDタンパク質、日本脳炎ウイルスのE 1あるいはpre-Mタンパク質、ロタウイルスの外殻糖タンパク質VP 7や外殻タンパク質VP 4、ヒト免疫不全ウイルスのgp120やgp160タンパク質、Leishmania majorの主要表面抗原タンパク質、マラリアのスポロゾイドの主要表面抗原(circum sporozoite protein)タンパク質、  
20 トキソプラズマの54-kdやCSタンパク質、虫歯の原因となるStreptococcus mutansの菌体表層タンパク質PAcをコードする遺伝子；また、MAGE-1、MAGE-3またはBAGEなどの癌退縮抗原や、チロシナーゼ、Mart-1、gp100、gp75などの組織特異抗原、p15、Mucl、CEA、HPV E6、E7、HPR2/neuなどをコードする遺伝子、および「Immunization with DNA」:Journal of Immunological Methods,176  
25 巻,1994年,145-152頁に記載されている遺伝子の核酸を挙げることができるが、これに限定されるものではない。

「糖類」としては、医学的に許容される単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖もしくはこれらの糖アルコールまたはこれらの誘導体が挙げられる。本発明の遺伝子

製剤に添加されることにより、製剤の安定性を改善するならば、糖類の種類は特に限定されない。また、本発明遺伝子製剤は2つ以上の糖類の混合物を含有することができる。

5 糖類としては例えば、単糖としてグルコース、ガラクトース、フルクトース等が挙げられ、好ましくはグルコースである。二糖としてはシュクロース、マルトース、ラクトース、トレハロースが好ましい例として挙げられる。

糖アルコールとしてはソルビトール、マンニトール等が挙げられ、好ましくはマンニトールである。

10 糖誘導体には、デオキシ糖、アミノ糖、リン酸エステル類等、およびこれらを構成成分とする二糖がある。

「非疎水性アミノ酸類」とは、アミノ酸類の中でも、非疎水性の性質を有するアミノ酸類を意味する。ここに、「非疎水性」とは、水との親和性が比較的強い性質を意味し、本発明では、グリシンの水親和性を基準として、それよりも水親和性が強い性質を「非疎水性」と称する。なお、水親和性を数値化する指標は、  
15 例えばKyte, J. & Doolittle, R. F., 1982, J. Mol. Biol. 157, 105-132に記載されている。この基準によれば、非疎水性でないアミノ酸はグリシン、アラニン、メチオニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンである。「非疎水性アミノ酸類」として、好ましくはグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム、プロリンが挙げられ、より好ましくはグル  
20 タミン、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウムが挙げられる。

コラーゲンまたはゼラチンを含む本発明製剤における「アミノ酸類」としては医学的に許容されるアミノ酸およびその塩、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。本発明の遺伝子製剤に添加されることにより、製剤の安定性を改善するならばアミノ酸類はこれらに限定されない。アミノ酸類としてはグルタミン酸または  
25 アスパラギン酸などの酸性アミノ酸のみならず、一般に塩基性アミノ酸として分類されるリジン、アルギニン、ヒスチジン、および酸性、塩基性アミノ酸以外のグリシン、アラニン、メチオニン、プロリン、シスチン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、イソロイシン、システイン、チロシン、トリプトファン、ロイシンも包含される。よって、本発明におけるアミノ酸類とは、その水

溶液における液性とは無関係であり、他に塩基性あるいは中性の側鎖が存在しているアミノ酸も包含される。アミノ酸の塩としてはナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられる。コラーゲンまたはゼラチンを含む本発明製剤における「アミノ酸類」として、好ましくはグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム、プロリン、アルギニン、ヒスチジン、リジンが挙げられる。より好ましくは、コラーゲンとDNAの静電的な相互作用を弱める働きを有するグルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム、アルギニン、ヒスチジン、リジンが挙げられ、さらに好ましくはアルギニン、ヒスチジンが挙げられる。

10 「カルボキシル基を2個以上有する有機酸」としては、医学的に許容されるカルボキシル基を2個以上有する有機酸（アミノ酸類を除く）およびその塩、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。本発明の遺伝子製剤に添加されることにより、製剤の安定性を改善するならば有機酸類の種類はアミノ酸類以外であれば、特に限定されない。

15 カルボキシル基を2個以上有する有機酸およびその塩としては、好ましくはカルボキシル基を2あるいは3個含む有機酸およびその塩が挙げられ、より好ましくは飽和または不飽和脂肪族の該有機酸である。カルボキシル基を2あるいは3個含む有機酸およびその塩として、例えばクエン酸、酒石酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸およびその塩が挙げられ、好ましくはクエン酸、酒石酸の塩である。

20 本発明の遺伝子製剤には、上記の糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類のいずれかを含有する製剤およびこれらのうち任意の2者または3者すべてを含有する製剤が含まれ、またいずれの場合でも糖類、アミノ酸類および有機酸類ともに一つ以上を含有することができる。

25 本発明の遺伝子製剤における、糖類、非疎水性アミノ酸類、カルボキシル基を2個以上有する有機酸類の個別の、またはこれらを混合して用いた場合の全体の含有量、あるいはコラーゲンもしくはゼラチンを含む本発明遺伝子製剤におけるアミノ酸類の含有量は、本発明製剤に含有される遺伝子またはベクターの分解を抑制する効果が得られる量以上に設定することが望ましいが、該遺伝子またはベクターの濃度および量あるいは遺伝子製剤の実施形態によって適宜設定すること

ができる。例えば、pDNAを $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で溶解した $150\text{mM}$  NaCl,  $10\text{mM}$  Tris-HCl (pH7.4) 溶液を凍結乾燥して目的の遺伝子製剤を得る、あるいはこのようにして乾燥した遺伝子製剤を保存する場合には、 $1\%$  (w/v) 以上の糖類および/または非疎水性アミノ酸類および/またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を溶液に含有することが好ましい。なお、乾燥前あるいは実施形態である溶液状態の遺伝子製剤の通常用いられるpHはpH5~pH8の範囲であるが、好ましくはpH6~pH8の範囲であり、より好ましくはpH7~pH8の範囲である。

本発明遺伝子製剤には、医学的に許容される添加剤あるいは遺伝子発現を改善し得る物質を添加することができる。糖類、アミノ酸類および有機酸類の量は従ってこれらの添加剤の種類および量によっても変動し得る。

医学的に許容される添加剤として、例えば生体親和性材料あるいはゴマ油、スクワレン等の油類等が挙げられるがこれに限定されるものではない。

添加剤として使用する生体親和性材料に所望の遺伝子または該遺伝子を含むベクターを担持させれば、本発明遺伝子製剤を徐放性製剤にすることができる。ここに言う生体親和性材料とは、例えば、1) コラーゲン、ゼラチン、フィブリン、アルブミン、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、キチン、キトサン、アルギン酸、ペクチン、アガロースおよびアラビアゴム、2) グリコール酸、乳酸、アミノ酸の重合体およびこれらの二以上の共重合体、ならびに、3) ハイドロキシアパタイト、ポリメタクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレンおよびポリエチレン等を挙げることができるがこれに限られるものではない。好ましい例として、コラーゲン、ゼラチンまたはその混合物が挙げられる。

ここに、「担持させる」とは、所望の遺伝子または該遺伝子を含むベクターを生体親和性材料に均一に分散または包括させることを意味する。

遺伝子発現を改善し得る物質としては、遺伝子の細胞への導入を促進する物質または遺伝子の核への移行を促進する物質を挙げることができる。前者の例として、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、疎水性ポリマー等を挙げることができる。「カチオン性脂質」として、DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N-トリメチルアンモニウムクロライド)、DOSPA (2,3

ージオレイルオキシ-N- [2- (スぺルミンカルボキサミド) エチル] -N,  
N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート)、DDAB (ジメ  
チルジオクタクレシルアンモニウムブロミド)、TM-TPS (N, N<sup>I</sup>, N<sup>II</sup>, N<sup>III</sup>-テ  
トラメチル-N, N', N'', N'''-テトラパルミチルスぺルミン)、DMRIE (1,  
5 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウム  
ブロミド)、N- (α-トリメチルアンモニオアセチル) -ジドデシル-D-グ  
ルタメートクロライド (Biochemical Biophysical Research Communication,  
196, 1042(1994)) 等が挙げられ、これらのカチオン性脂質とDOPE (ジオレオ  
イル ホスファチジルエタノールアミン) 等の中性脂質からなるカチオン性リポソ  
ーム、カチオン性脂質とコレステロールとの混合物も用いることができる。「カ  
10 チオン性ポリマー」は遺伝子と静電的な相互作用をするポリマーであり、例えば  
DOGS (ジオクタデシルアミドグリシルスぺルミン) 等のリポポリアミン、AlkCWK  
18等のペプチド、ポリリジンやその誘導体 (Proceedings of Academy Sciences  
of the USA, 89, 6094(1992)) 等のカチオン性ポリアミノ酸およびその誘導体、  
15 ポリエチレンイミン、ポリアミドアミンデンドリマー等が挙げられる。「疎水性  
ポリマー」は遺伝子と疎水的な相互作用をするポリマーであり、例えばポリビ  
ニルアルコールやポリビニルピロリドン等が挙げられる。その他、AlkCWK<sub>18</sub>等のペ  
プチドも用いることができる。ここに、カチオン性リポソームとしては、例えば  
20 DOSPAとDOPEを1:1で含むLIPOFECTAMINE (登録商標、Life Technologies, Inc.,  
ロックビル, MD, USA)、DOTMAとDOPEを1:1で含むリポソーム、DDABとDOPEを  
1:2.5で含むLIPOFECTACE (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビ  
ル, MD, USA)、TM-TPSとDOPEを1:1.5で含むCELLFECTIN (登録商標、Life  
Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA) 等を挙げることができるが、これらに  
限定されない。また、ここで言うカチオン性脂質とコレステロールの混合物とは、  
25 例えばDMRIEとコレステロールのモル比で1:1の混合物であるDMRIE-C (Life  
Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA) を挙げることができる。あるいは、遺伝  
子の細胞内におけるエンドソームでの分解を抑えるために、例えばエンドソーム  
の内容物を放出する能力を有する不活化したアデノウイルス、CHEMS (コレステ  
ロールヘミスクシネートモルホリン塩) 等を用いることもできる。

遺伝子の核への移行を促進する物質としては、HMG-1、2混合物 (high mobility group-1, 2 mixture: 実験医学, 12, 184(1994)) 等を挙げることができる。

5 本発明遺伝子製剤の形状には特に制限はなく、例えば溶液状、懸濁液状、ゲル状、スポンジ状、粉末状、微粒子状、棒状、フィルム状などの形態をとることができる。

溶液状の遺伝子製剤の製造方法としては、例えば、

1) 必要に応じて添加剤を添加した所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクターの溶液に糖類および/または非疎水性アミノ酸類および/またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を加えて溶解し、均一な溶液状態の遺伝子製剤を得る方法、および

10

2) 必要に応じて添加剤を添加した所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクターの溶液に糖類および/または非疎水性アミノ酸類および/またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類の溶液を加えて混合し、均一な溶液状態の遺伝子製剤を得る方法、が挙げられる。

15

あるいは、コラーゲンまたはゼラチンを含む溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクターの溶液およびアミノ酸類またはアミノ酸類の溶液を加えて溶解または混合し、均一な溶液状態の遺伝子製剤を得る方法も包含される。

20 微粒子状の遺伝子製剤の製造方法としては、例えば、

1) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および/または非疎水性アミノ酸類および/またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を噴霧乾燥する方法、および

2) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および/または非疎水性アミノ酸類および/またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さら

25

に必要に応じて添加剤を添加した溶液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉砕する方法、が挙げられる。

あるいは、コラーゲンまたはゼラチンを含む溶液に、必要に応じて添加剤を添加した所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクターの溶液およびアミノ酸類

またはアミノ酸類の溶液を加えて溶解または混合して得た溶液を噴霧乾燥し、あるいは該溶液を凍結乾燥し該凍結乾燥品を粉碎する方法も包含される。

棒状の遺伝子製剤の製造方法としては、例えば、

- 5 1) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を噴霧乾燥して得られた微粒子を棒状に圧縮成形する方法、
- 10 2) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して得られた微粒子を棒状に圧縮成形する方法、
- 15 3) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を凍結乾燥し、得られたスポンジを棒状に圧縮成形する方法、
- 4) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を凍結乾燥し、得られたスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから棒状に押し出し、乾燥する方法、および
- 20 5) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を噴霧乾燥し、得られた微粒子を液状あるいは混粘可能な程度に柔らかいゴム状のシリコンと混合し、硬化剤を加え、ノズルから棒状に押し出す方法、が挙げられる。

- 25 あるいは、コラーゲンまたはゼラチンを含む場合は、上記方法にコラーゲンまたはゼラチンおよびアミノ酸類を使用する以外は同様の方法が包含される。

本発明の遺伝子製剤は、治療目的の疾患、標的臓器等に応じ、種々の方法で投与することができる。例えば、皮下、筋肉内等に投与することができ、また腎臓、肝臓、肺、脳等の疾患の対象部位に直接投与することができる。疾患部位に直接

投与すれば臓器選択的に治療することができる。

本発明により得られる遺伝子製剤の効果を、所望の遺伝子を含むベクターとしてプラスミドDNA (pDNA) を用いた場合を例に以下説明する。

- 5 1) pDNA単独あるいはpDNAと糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類以外の添加物（医学的に許容される添加剤、生体親和性材料、遺伝子導入を促進する物質等）を含む溶液を製剤化すべく一般に用いられる凍結乾燥に付した場合、いずれの場合も凍結乾燥後にpDNAの分解がみられるが、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を含む組成で凍結乾燥した場合、これらを含まない組成で凍結乾燥した場合に比べて、pDNAの分解が抑制された。
- 10 2) pDNA単独あるいはpDNAと糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類以外の添加物（医学的に許容される添加剤、生体親和性材料、遺伝子導入を促進する物質等）を含む溶液を乾燥させて得た乾燥品を40℃で保存した場合、いずれの場合もpDNAの分解が見られるが、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を含む組成の溶液を乾燥させて得た乾燥品を保存した場合、これらを含まない場合に比べて、pDNAの分解が抑制された。
- 15 3) pDNAとコラーゲンまたはゼラチンを含む溶液を製剤化すべく一般に用いられる凍結乾燥に付した場合、いずれの場合にも凍結乾燥後にpDNAの分解が見られるが、アミノ酸類を含む組成で凍結乾燥した場合、これらを含まない組成で凍結乾燥した場合に比べ、pDNAの分解が抑制された。
- 20 4) pDNAとコラーゲンまたはゼラチンを含む溶液を乾燥させて得た乾燥品を40℃で保存した場合、いずれの場合もpDNAの分解が見られるが、アミノ酸類を含む組成の溶液を乾燥させて得た乾燥品を保存した場合、これらを含まない場合に比べ、pDNAの分解が抑制された。
- 25

このような糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を含む組成によるpDNAの安定化効果は、上記のような乾燥工程および乾燥状態での保存時のみならず、溶液状態でも得ることができる。特に、遺伝子の導入効率を向上させることを目的に用いられるカチオ



ン脂質類を含有した組成でその効果が顕著である。すなわち、

- 5) pDNA単独あるいはpDNAと糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類以外の添加物（医学的に許容される添加剤、生体親和性材料、遺伝子導入を促進する物質等）およびカチオン脂質類を含有した組成の溶液を溶液状態で保存した場合、いずれの場合もpDNAの分解が見られるが、糖類および/または非疎水性アミノ酸類および/またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を含有する組成の溶液を保存した場合、これらを含まない場合に比べて、pDNAの分解が抑制された。

前記本発明製剤の遺伝子分解抑制（安定化）効果は、後述の試験例と表9に具体的に示されている。

また、本発明で得られたHST-1/FGF4をコードするpDNAとコラーゲンおよびグルコースからなる棒状の遺伝子製剤をマウスの筋肉内に投与した場合、投与後38日間に亘って血中にpDNAが検出され、投与後60日以上に亘ってHST-1遺伝子の発現が血中および投与部位で認められた。一方、溶液でpDNAを投与した場合には、投与後30日間しかHST-1遺伝子の発現が認められなかった。この結果は、pDNAはコラーゲンおよびグルコースからなる棒状の遺伝子製剤から徐放されたのと同時に、遺伝子製剤内で長期間安定に保存されていることを示している。

### 実施例

以下に実施例、参考例および試験例を挙げ、本発明を更に詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例および試験例により限定されるものではない。

以下の実施例においては、繊維芽細胞増殖因子HST-1 (FGF4) の遺伝子 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2980-2984 (1987)) を組み込んだプラスミドベクター pCAHST-1 を含む製剤の調製につき説明する。HST-1 遺伝子産物は巨核球に対して血小板増加因子として作用するものであり、癌の化学療法や放射線療法の際の重篤な副作用である血小板減少症を効果的に抑制することが明らかとなっている

(J. Clin. Invest., 96:1125-2230, 1995, Oncogene, 13:9-19, 1996)。pCAHST-1 は、発現ベクター pCAGGS (Gene, 108, 193-200 (1991)) の CAG プロモーター部とポリ A 配列との間に HST-1 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターである。なお、

CAGプロモーターは、高発現ベクターとして特開平3-168087号公報に記載されている。

#### 実施例 1

##### 5 アミノ酸を含有する遺伝子製剤 (乾燥状態)

10  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のpCAHST-1および  $10 \text{mg}/\text{ml}$  のグリシン、アラニン、グルタミン酸ナトリウムまたはリジン塩酸塩を含有する  $150\text{mM}$  NaCl,  $10\text{mM}$  Tris-HCl (pH7.4) 溶液をそれぞれ調製した。調製した溶液の  $1 \text{ml}$  を  $-40^\circ\text{C}$  で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、乾燥状態の遺

10 伝子製剤を調製した。

#### 実施例 2

##### 糖類を含有する遺伝子製剤 (乾燥状態)

15  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のpCAHST-1および  $10 \text{mg}/\text{ml}$  のグルコース、シュークロース、マルトース、ラクトースまたはマンニトールを含有する  $150\text{mM}$  NaCl,  $10\text{mM}$  Tris-HCl (pH7.4) 溶液をそれぞれ調製した。調製した溶液の  $1 \text{ml}$  を  $-40^\circ\text{C}$  で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、乾燥状態の遺伝子製剤を調製した。

#### 実施例 3

##### カルボキシル基 2 個以上を含む有機酸類およびアミノ酸を含有する遺伝子製剤 (乾燥状態)

20  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のpCAHST-1および  $10 \text{mg}/\text{ml}$  のグルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム二水和物またはクエン酸三ナトリウム二水和物を含有する  $150\text{mM}$  NaCl,  $10\text{mM}$  Tris-HCl (pH7.4) 溶液を調製した。調製した溶液の  $1 \text{ml}$  を  $-40^\circ\text{C}$  で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このよ

25 うに凍結乾燥によって、乾燥状態の遺伝子製剤を調製した。

#### 実施例 4

##### 糖類およびカチオン性脂質を含有する遺伝子製剤 (乾燥状態)

$3 \mu\text{g}/\text{ml}$  のpCAHST-1、 $24 \mu\text{g}/\text{ml}$  のDMRIE-C (Gibco BRL社製、遺伝子導入促進成分) および  $10 \text{mg}/\text{ml}$  のシュークロースを含有する  $150\text{mM}$  NaCl,

10mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液を調製した。調製した溶液の 1 ml を -40℃ で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、乾燥状態の遺伝子製剤を調製した。

#### 実施例 5

##### 5 糖類および遺伝子導入促進成分を含有する遺伝子製剤 (溶液状)

150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液に、pCAHST-1、DMRIE-C (Gibco BRL 社製) およびグルコースをそれぞれの最終濃度が  $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $24 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \text{mg/ml}$  になるように混合した。このようにして、液状の遺伝子製剤を得た。

##### 10 実施例 6

##### 徐放性遺伝子製剤 (ゲル状)

0.1 w/w% アテロコラーゲン溶液 ( $500 \text{mg}$ ) に  $100 \mu\text{g/ml}$  の pCAHST-1 溶液 ( $200 \mu\text{l}$ ) および  $10 \text{mg/ml}$  のグルコース、シュークロースまたはグルタミン酸ナトリウム溶液 ( $500 \mu\text{l}$ ) を加え、混合後  $37^\circ\text{C}$  に保温することによって、ゲル状の遺伝子製剤を調製した。なお、本実施例および以下の実施例・参考例において用いたアテロコラーゲンは (株) 高研から入手できる。

#### 実施例 7

##### 徐放性遺伝子製剤 (スポンジ状)

20 実施例 6 で調製した、グルコースを含有するゲル状の遺伝子製剤を凍結乾燥した。これにより  $500 \mu\text{g}$  のアテロコラーゲン、 $20 \mu\text{g}$  の pCAHST-1、 $5 \text{mg}$  のグルコース、シュークロースまたはグルタミン酸ナトリウム塩を含有するスポンジ状の遺伝子製剤を得た。

#### 実施例 8

##### 25 徐放性遺伝子製剤 (棒状)

0.86 w/w% アテロコラーゲン溶液 ( $29.1 \text{g}$ ) に水 ( $60 \text{g}$ )、 $11 \text{mg/ml}$  のグルコース溶液 ( $10 \text{ml}$ ) を加え混合した後、 $100 \mu\text{g/ml}$  の pCAHST-1 溶液 ( $80 \text{ml}$ ) を加え混合した。得られた溶液を凍結乾燥した後、この凍結乾燥品に適当量の蒸留水を加えて練合した。その後、練合品をシリンジ

に入れ押し出しを行い、さらに乾燥してpCAHST-1の収率74%の製剤を得た。すなわち、1mgあたり17 $\mu$ gのpCAHST-1、300 $\mu$ gのグルコースを含有する棒状の遺伝子製剤を得た。

5      参考例 1

アミノ酸を加えないこと以外は、実施例1に記載の操作に従い、乾燥状態の組成物を調製した。

参考例 2

10      シュクロースを加えないこと以外は、実施例4に記載の操作に従い、乾燥状態の組成物を調製した。

参考例 3

グルコースを加えないこと以外は、実施例5に記載の操作に従い、液状の組成物を得た。

参考例 4

15      糖類の溶液またはグルタミン酸ナトリウム溶液を加えないこと以外は、実施例6および7に記載の操作に従い、500 $\mu$ gのアテロコラーゲンおよび20 $\mu$ gのpCAHST-1を含有するスポンジ状の組成物を得た。

参考例 5

20      グルコース溶液を加えないこと以外は、実施例8に記載の操作に従い、1mgあたり20 $\mu$ gのpCAHST-1を含有する棒状の乾燥組成物を得た。

参考例 6

pCAHST-1溶液を加えないこと以外は、実施例8に記載の操作に従い、1mgあたり300 $\mu$ gのグルコースを含有する棒状の乾燥組成物を得た。

25      試験例 1

凍結乾燥時におけるアミノ酸の遺伝子分解抑制効果

実施例1の遺伝子製剤および参考例1の組成物を、凍結乾燥直後に水に溶解し、アガロース電気泳動に付してpCAHST-1の一次構造を評価した。

アガロース電気泳動は水平型電気泳動ユニット (Mupid、(株) アドバン

ス) にて、TAE緩衝液中で0.8%アガロースゲルを用いて行った。電気泳動後、エチジウムブロマイドでゲルを染色し、トランスイルミネーター上で撮影した。その映像を写真スキャナーで取り込み、一次構造が保持されたスーパーコイル型pDNA (CC) と切断されたpDNA (OC) のバンドを含むすべてのバンドの強度を解析ソフトで算出し、CCの比率、すなわち一次構造保持率 (CC保持率) を計算した。この場合、無処理のpDNAのCC保持率を100とした。試験例2以降においてもアガロース電気泳動を実施する場合にはこの方法を用いた。

得られた結果を以下の表1および図1に示す。図中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OCは切断されたpCAHST-1を示す。各レ

ーンは次を意味する；

レーン 1: 分子量マーカー ( $\lambda$ Hind III)

レーン 2: 無添加 (参考例1)

レーン 3: グルタミン酸一ナトリウム (実施例1)

レーン 4: グリシン (実施例1)

レーン 5: アラニン (実施例1)

レーン 6: フェニルアラニン

レーン 7: リジン塩酸塩 (実施例1)

レーン 8: 無処理

表1

アミノ酸を含有するpCAHST-1溶液の凍結乾燥後のCC保持率 (%無処理)	
処 方	CC保持率 (%無処理)
無添加 (参考例1)	72
グルタミン酸一ナトリウム (実施例1)	96
グリシン (実施例1)	79
アラニン (実施例1)	83
フェニルアラニン	73
リジン塩酸塩 (実施例1)	84
無処理	100

結果は、グルタミン酸一ナトリウムを製剤に加えることで、アミノ酸無添加の

製剤に比べて、pCAHST-1の分解が抑えられることを示している。

## 試験例 2

### 凍結乾燥時における糖類の遺伝子分解抑制効果

- 5 実施例 2 の遺伝子製剤および参考例 1 の組成物を、凍結乾燥直後に水に溶解し、試験例 1 の操作に従い、アガロース電気泳動に付してpCAHST-1の一次構造を評価した。得られた結果を以下の表 2 および図 2 に示す。結果は、グルコース、シュークロース、マルトース、ラクトースおよびマンニトールを製剤に加えることで、糖類無添加の製剤に比べてpCAHST-1の分解が大幅に抑えられることを示している。

10 表 2

糖類を含有するpCAHST-1溶液の凍結乾燥後のCC保持率 (%無処理)

処 方	CC保持率 (%無処理)
無添加 (参考例 1)	7 8
グルコース (実施例 2)	9 5
15 シュークロース (実施例 2)	9 6
マルトース (実施例 2)	9 5
ラクトース (実施例 2)	1 0 0
マンニトール (実施例 2)	9 5
無処理	1 0 0

- 20 図 2 中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OCは切断されたpCAHST-1を示す。各レーンは次を意味する；

- レーン 1: 分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)  
 レーン 2: 無添加 (参考例 1)  
 レーン 3: グルコース (実施例 2)  
 25 レーン 4: シュークロース (実施例 2)  
 レーン 5: マルトース (実施例 2)  
 レーン 6: ラクトース (実施例 2)  
 レーン 7: マンニトール (実施例 2)  
 レーン 8: 無処理

試験例 3凍結乾燥時におけるカルボキシル基 2 個以上を含む有機酸類およびアミノ酸の遺伝子分解抑制効果

- 5 実施例 3 の遺伝子製剤および参考例 1 の組成物を凍結乾燥直後に水で溶解し、試験例 1 に記載の操作に従って、アガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を評価した。得られた結果を以下の表 3 および図 3 に示す。結果は、グルタミン酸一ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム二水和物あるいはクエン酸三ナトリウム二水和物を製剤に加えることで、有機酸類無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の分解が大幅に抑えられることを示している。

表 3

カルボキシル基 2 個以上を含む有機酸類およびアミノ酸  
を含有する pCAHST-1 緩衝液の凍結乾燥後の CC 保持率 (% 無処理)

処	方	CC 保持率 (% 無処理)
15	無添加 (参考例 1)	7 6
	グルタミン酸一ナトリウム (実施例 3)	1 0 3
	アスパラギン酸ナトリウム (実施例 3)	9 1
	酒石酸ナトリウム二水和物 (実施例 3)	9 5
	クエン酸三ナトリウム二水和物 (実施例 3)	1 0 2
20	無処理	1 0 0

図 3 中、CC は一次構造が保持されたスーパーコイル型 pCAHST-1 を示し、OC は切断された pCAHST-1 を示す。各レーンは次を意味する；

レーン 1: 分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)

レーン 2: 無添加 (参考例 1)

25 レーン 3: グルタミン酸一ナトリウム (実施例 3)

レーン 4: アスパラギン酸ナトリウム (実施例 3)

レーン 5: 酒石酸ナトリウム二水和物 (実施例 3)

レーン 6: クエン酸三ナトリウム二水和物 (実施例 3)

レーン 7: 無処理

試験例 4カチオン性脂質を含有する遺伝子溶液の凍結乾燥時におけるシュークロースの遺伝子分解抑制効果

- 5 実施例 4 の遺伝子製剤および参考例 2 の組成物を凍結乾燥直後に水で溶解し、試験例 1 の操作に従ってアガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を評価した。得られた結果を以下の表 4 および図 4 に示す。結果は、シュークロースを製剤に加えることで、無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の分解が抑制されることを示している。

10 表 4カチオン性脂質を含有する pCAHST-1 溶液の凍結乾燥後の CC 保持率 (% 無処理)

処 方	CC 保持率 (% 無処理)
無添加 (参考例 2)	6 9
シュークロース (実施例 4)	1 0 0
無処理	1 0 0

15

図 4 中、CC は一次構造が保持されたスーパーコイル型 pCAHST-1 を示し、OC は切断された pCAHST-1 を示す。各レーン は次を意味する；

レーン 1 : 分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)

レーン 2 : 無添加 (参考例 2)

20

レーン 3 : シュークロース (実施例 4)

レーン 4 : 無処理

試験例 540℃保存時におけるグルコースの遺伝子分解抑制効果 (1)

25

実施例 2 の遺伝子製剤のうちグルコース処方の乾燥状態の製剤および参考例 1 の組成物を 40℃ で 1、2、および 4 週間保存した。保存後の pCAHST-1 の一次構造を試験例 1 の操作に従ってアガロース電気泳動で評価した。得られた結果を以下の表 5 および図 5 に示す。結果は、グルコースを製剤に加えることで、グルコース無添加の製剤に比べ、係る条件下での pCAHST-1 の保存安定性が大幅に改善さ



れることを示している。

表 5

グルコースを含有するpCAHST-1乾燥品の40℃保存後のCC保持率(%無処理)

処 方		CC保持率(%無処理)
5	無添加(参考例1/40℃-1週間)	67
	無添加(参考例1/40℃-2週間)	56
	無添加(参考例1/40℃-4週間)	34
	グルコース(実施例2/40℃-1週間)	92
	グルコース(実施例2/40℃-2週間)	91
10	グルコース(実施例2/40℃-4週間)	71
	無処理	100

図5中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OCは切断されたpCAHST-1を示す。各レーンは次を意味する；

- レーン 1: 分子量マーカー ( $\lambda$ Hind III)
- 15 レーン 2: 無添加(参考例1/40℃-1週間)
- レーン 3: 無添加(参考例1/40℃-2週間)
- レーン 4: 無添加(参考例1/40℃-4週間)
- レーン 5: グルコース(実施例2/40℃-1週間)
- レーン 6: グルコース(実施例2/40℃-2週間)
- 20 レーン 7: グルコース(実施例2/40℃-4週間)
- レーン 8: 無処理

#### 試験例6

##### 37℃保存時におけるシュークロースの遺伝子分解抑制効果

- 25 実施例4の遺伝子製剤および参考例2の組成物を37℃で4週間保存した。保存後のpCAHST-1の構造を試験例1記載のアガロース電気泳動で評価した。得られた結果を以下の表6および図6に示す。結果は、シュークロースを製剤に加えることで、シュークロース無添加の製剤に比べ、係る条件下でのpCAHST-1の保存安定性が大幅に改善されることを示している。

表 6

カチオン性脂質を含有するpCAHST-1溶液の乾燥品

37℃-4週間保存後のCC保持率(%無処理)

5	処 方	CC保持率(%無処理)
	無添加(参考例2/37℃-4週間)	8.5
	シュークロース(実施例4/37℃-4週間)	6.7
	無処理	100

図6中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OCは切断されたpCAHST-1を示す。各レーンは次を意味する；

レーン 1: 分子量マーカー ( $\lambda$ Hind III)

レーン 2: 無添加(参考例2/37℃-4週間)

レーン 3: シュークロース(実施例4/37℃-4週間)

レーン 4: 無処理

15

試験例 740℃保存時におけるグルコースの遺伝子分解抑制効果(2)

実施例5の液状遺伝子製剤および参考例3の組成物を40℃で4週間保存した。保存後のpCAHST-1の一次構造を試験例1記載のアガロース電気泳動で評価した。得られた結果を図7に示す。結果は試験例5における乾燥製剤と同様に、グルコースを製剤に加えることで、グルコース無添加の製剤に比べ、係る条件下でのpCAHST-1の保存安定性が大幅に改善されることを示している。

20

図7中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OCは切断されたpCAHST-1を示す。各レーンは次を意味する；

レーン 1: 無処理

レーン 2: グルコース(実施例5/40℃-4週間)

レーン 3: 無添加(参考例3/40℃-4週間)

レーン 4: 分子量マーカー ( $\lambda$ Hind III)

25

試験例 8コラーゲン含有時における糖類等の遺伝子分解抑制効果 (1)

実施例 7 のスポンジ状の遺伝子製剤および参考例 4 のスポンジ状の組成物を 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7. 4) 溶液で加温下に溶解し、コラゲナーゼで処理した。処理後、試験例 1 に記載のようにしてアガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を評価した。その結果、グルコース、シュークロースおよびグルタミン酸一ナトリウムを製剤に加えることで、糖類無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の分解を大幅に抑えることができた (図 8、表 7)。

表 7

10                    コラーゲン、糖類およびアミノ酸を含有する

pCAHST-1 溶液の凍結乾燥後の CC 保持率 (% 無処理)

処            方	CC 保持率 (% 無処理)
無添加 (参考例 4)	8 5
グルコース (実施例 7)	9 4
15            シュークロース (実施例 7)	9 5
グルタミン酸一ナトリウム (実施例 7)	9 5
無処理	1 0 0

図 8 中、CC は一次構造が保持されたスーパーコイル型 pCAHST-1 を示し、OC は切断された pCAHST-1 を示す。各レーン は次を意味する；

- 20            レーン 1 : 分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)
- レーン 2 : グルコース (実施例 7)
- レーン 3 : シュークロース (実施例 7)
- レーン 4 : グルタミン酸一ナトリウム (実施例 7)
- レーン 5 : 無添加 (参考例 4)
- 25            レーン 6 : 無処理

試験例 9コラーゲン含有時における糖類等の遺伝子分解抑制効果 (2)

実施例 8 の棒状の遺伝子製剤および参考例 5 の棒状の組成物を 137mM NaCl,

2.7mM KCl, 25mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液で加温下で溶解し、コラゲナーゼで処理した。処理後、試験例1に記載のようにしてアガロース電気泳動に付し、pCAHST-1の構造を評価した。その結果、グルコースを製剤に加えることで、グルコース無添加の製剤に比べてpCAHST-1の分解を大幅に抑えることができた(図9、表8)。

表8

棒状組成物中に含まれるpCAHST-1のCC保持率(%無処理)

処	方	CC保持率(%無処理)
	無添加(参考例5)	66
	グルコース(実施例8)	92
	無処理	100

図9中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OCは切断されたpCAHST-1を示す。各レーンは次を意味する；

レーン1：分子量マーカー( $\lambda$ Hind III)

レーン2：無添加①(参考例5)

レーン3：無添加②(参考例5)

レーン4：グルコース①(実施例8)

レーン5：グルコース②(実施例8)

レーン6：無処理

## 試験例10

## 安定な遺伝子製剤を用いた遺伝子導入

実施例8の棒状の遺伝子製剤(アテロコラーゲン/グルコース-pCAHST-1)および参考例5の棒状の組成物(アテロコラーゲン-pCAHST-1)をそれぞれ50 $\mu$ gのpCAHST-1を含有するように切断した。これらをICRマウス(雌性、6-7週齢)の右大腿部筋肉内に投与した(投与群1：実施例8の遺伝子製剤、投与群2：参考例5の組成物)。また、50 $\mu$ gのpCAHST-1を含有するリン酸緩衝液100 $\mu$ lもマウス右大腿部筋肉内に投与した(投与群3)。

インビボにおける徐放効果を調べるため、血中pCAHST-1の検出、血中および投

与部位のHST-1量および血中の血小板数の3つの測定値を利用した。血中のpCAHST-1はPCR法で検出し、血中および投与部位（筋肉組織中）のHST-1量はELISA法で測定し、血中の血小板数は顕微鏡下でのカウントにて、それぞれ経時的に行った。

- 5 PCR法では、pCAHST-1(約8 kbp)中の262 bpを検出するプローブを使用し、Ampridirect法（島津製作所）を用いた。測定限界は、サザンブロッティングで1 pg/5  $\mu$  l、エチジウム染色で2 pg/5  $\mu$  lであった。ELISA法では、FGF4キット（R&Dシステムズ社、アメリカ合衆国、検出限界20 pg/ml）を使用した。血小板数の測定は、採血後、血小板以外の血球成分を分解処理し、顕微鏡下でカウントすることにより実施した。

- 10 PCR法による血中pCAHST-1の測定結果を図10に示す。投与群1では、血中でpCAHST-1は投与後6時間から検出され、その後38日間に亘って検出された。投与群2では、血中でpCAHST-1は投与後6時間から検出され、その後18日間に亘って検出された。投与群3では、血中でpCAHST-1は投与後7日間のみ検出された。

- 15 血中および投与部位でのHST-1量の測定結果をそれぞれ図11、図12に示す。図11中、各記号は次を意味する； 白抜き丸：アテロコラーゲン/グルコース-pCAHST-1(投与群1、実施例8)、黒塗り丸：アテロコラーゲン-pCAHST-1(投与群2、参考例5)、黒塗り四角：pCAHST-1を含有するリン酸緩衝液(投与群3、対照例)、白抜き四角：アテロコラーゲン/グルコース(参考例6)。

- 20 図12中、各記号は次を意味する； 白抜き丸：アテロコラーゲン/グルコース-pCAHST-1(投与群1、実施例8)、黒塗り丸：アテロコラーゲン-pCAHST-1(投与群2、参考例5)、黒塗り四角：pCAHST-1を含有するリン酸緩衝液(投与群3、対照例)、白抜き四角：アテロコラーゲン/グルコース(参考例6)。

- 25 投与群1では、HST-1量は血中および投与部位共に投与後増加し、30日後に最大に達した後徐々に減少したが、60日後も検出された。投与群2では、投与群1と同様に血中および投与部位でのHST-1量は投与後増加し、30日後に最大に達した後徐々に減少し40日後殆ど検出限界となり、総体的に投与群1に比べて産生されたHST-1量は少なかった。投与群3では、血中および投与部位でのHST-1量は、投与後増加し、10日後に最大に達した後徐々に減少し、30日後には検出されな

った。

血中の血小板数を経時的に測定した結果(図13)、投与群1では、血小板数は投与後増加し、30日後に最大に達した後徐々に減少したが、60日後も増加傾向を維持した。投与群2では、血小板数は投与後徐々に増加し、14日後に最大に達した後減少し、28日以降も低値ながら増加傾向を維持した。投与群3では、血小板数は投与後増加し、10日後に最大に達した後徐々に減少し、25日間に正常値に戻った。

図13中、各記号は次を意味する； 白抜き丸：アテロコラーゲン／グルコース-pCAHST-1(投与群1、実施例8)、黒塗り丸：アテロコラーゲン-pCAHST-1(投与群2、参考例5)、黒塗り四角：pCAHST-1を含有するリン酸緩衝液(投与群3、対照例)、白抜き四角：アテロコラーゲン／グルコース(参考例6)。

対照として、pCAHST-1を含まない参考例6の組成物も同様にマウス右大腿部筋肉内に投与し、投与後、血中および投与部位のHST-1量をELISA法で測定し、血中の血小板数を経時的に測定した。その結果、測定期間中、血中および投与部位でHST-1は検出されなかった。また、測定期間中、血小板数は増加しなかった。このことは、実施例8の遺伝子製剤を用いて得られた投与群1および投与群2でのHST-1の産生および血小板数の増加が、製剤中に含有されたpCAHST-1が細胞内に導入され、細胞内でHST-1の遺伝情報を発現したことによって生じたことを示している。

投与群1と投与群3の結果から、pCAHST-1を単独で投与した場合、HST-1の体内での発現および産生されたHST-1による生物学的な効果は一過的であるのに対して、実施例8の遺伝子製剤では長期間pCAHST-1を徐放すると共に、安定に体内で保持してHST-1の発現期間を延長し、かつ産生されたHST-1による生物学的な効果を長期間維持できることが判った。

投与群1と投与群2の結果から、実施例8と参考例5の遺伝子製剤では共に、pCAHST-1を単独で投与した場合に比べて、pCAHST-1を徐放すると共にHST-1の発現期間を延長できるが、グルコースを含有する実施例8の遺伝子製剤では参考例5の遺伝子製剤に比べて、pCAHST-1を安定に体内で保持し、HST-1の発現期間を高い産生量で延長維持し、それによってHST-1による生物学的な効果をより高い

状態で長期間維持できることが判った。

以下、実施例 9 - 12 により調製した調製物について試験例 11 - 16 を行い、  
コラーゲンの存在または不存在下におけるアミノ酸または糖類の遺伝子に対する  
安定性の寄与を主として調べた。

#### 実施例 9

##### アミノ酸を含有する遺伝子製剤 (乾燥状態)

10  $\mu$ g/ml の pCAHST-1 および 10mg/ml のアルギニン、リジン塩酸塩、アスパラギン、アスパラギン酸ナトリウム、グルタミン、グルタミン酸ナトリウム、ヒスチジン、プロリン、セリン、トレオニン、グリシン、アラニン、メチオニン、バリン、イソロイシンあるいは 5mg/ml のロイシンを含有する 150mM NaCl、10mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液をそれぞれ調製した。調製した溶液の 1ml を -40°C で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、乾燥状態の遺伝子製剤を調製した。

#### 実施例 10

##### 糖類を含有する遺伝子製剤 (乾燥状態)

10  $\mu$ g/ml の pCAHST-1 および 10mg/ml のトレハロース、マルチトール、ラクトース、マルトース、グルコース、ソルビトール、コンドロイチン硫酸ナトリウムまたはキシリトールを含有する 150mM NaCl、10mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液をそれぞれ調製した。調製した溶液の 1ml を -40°C で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、乾燥状態の遺伝子製剤を調製した。

#### 実施例 11

##### アミノ酸を含有する徐放性遺伝子製剤 (スポンジ状)

0.1w/w% アテロコラーゲン溶液 (500mg) に 20  $\mu$ g/ml の pCAHST-1 溶液 (1ml) および 40mg/ml のアルギニン、リジン塩酸塩、アスパラギン、アスパラギン酸ナトリウム、グルタミン、グルタミン酸ナトリウム、ヒスチジン、プロリン、セリン、トレオニン、グリシン、アラニン、メチオニン、バリン、イソロイシンあるいは

20mg/mlのロイシン溶液(125 $\mu$ l)を混合した溶液をそれぞれ調製した。調製した溶液の1mlを-40℃で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、スポンジ状の遺伝子製剤を調製した。

## 5 実施例 1 2

### 糖類を含有する徐放性遺伝子製剤 (スポンジ状)

0.1w/w%アテロコラーゲン溶液(500mg)に20 $\mu$ g/mlのpCAHST-1溶液(1ml)および40mg/mlのトレハロース、マルチトール、ラクトース、マルトース、グルコース、ソルビトール、コンドロイチン硫酸ナトリウムまたはキシリトール溶液(125 $\mu$ l)を混合した溶液をそれぞれ調製した。調製した溶液の1mlを-40℃で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、スポンジ状の遺伝子製剤を調製した。

## 15 試験例 1 1

### 凍結乾燥時におけるアミノ酸の遺伝子分解抑制効果

実施例 9 の遺伝子製剤および参考例 1 の組成物を、凍結乾燥直後に水に溶解し、試験例 1 の操作に従い、アガロース電気泳動に付してpCAHST-1の一次構造を解析した。電気泳動後、エチジウムブロマイドでゲルを染色し、トランスイルミネーター上で撮影した。その映像を写真スキャナーで取り込み、一次構造が保持されたスーパーコイル型pDNA(CC)と一カ所が切断されたリラックス型pDNA(OC)、さらに切断され開環状になった直鎖型DNA(LS)のバンドの強度を解析ソフトで算出し、下式に従ってアミノ酸の添加による安定化度を計算した。結果を図 1 4 に示した。図 1 4 中のアミノ酸の順は、疎水親水度(Kyte, J. & Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157, 105-132)の順である。結果は、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸ナトリウム、グルタミン、グルタミン酸ナトリウム、ヒシチジン、プロリン、セリンまたはトレオニンを製剤に加えることで、アミノ酸無添加の製剤に比べてpCAHST-1の分解が抑制されていることを示している。



$$\text{参考例 1 の CC 保持率 (\%)} = \frac{\text{参考例 1 の CC の バンド 強度}}{\text{参考例 1 の 全 バンド 強度 の 総和 (CC + LS + OC)}} \times 100$$

$$\text{実施例 9 の CC 保持率 (\%)} = \frac{\text{実施例 9 の CC の バンド 強度}}{\text{実施例 9 の 全 バンド 強度 の 総和 (CC + LS + OC)}} \times 100$$

$$\text{安定化度 (\%)} = \frac{\text{実施例 9 の CC 保持率} - \text{参考例 1 の CC 保持率}}{100 - \text{参考例 1 の CC 保持率}} \times 100$$

### 試験例 1 2

#### 凍結乾燥時における糖類の遺伝子分解抑制効果

実施例 1 0 の遺伝子製剤および参考例 1 の組成物を、凍結乾燥直後に水に溶解し、試験例 1 1 の操作に従い、アガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を解析した。試験例 1 1 と同様に安定化度を算出し、その結果を図 1 5 に示した。結果は、糖類を製剤に加えることで、糖類無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の分解が抑制されていることを示している。

### 試験例 1 3

#### コラーゲン含有時におけるアミノ酸類の遺伝子分解抑制効果

実施例 1 1 のスポンジ状の遺伝子製剤及び参考例 4 のスポンジ状の組成物を 150mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液で加温下に溶解し、コラゲナーゼで処理した。処理後、試験例 1 1 に記載したようにしてアガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を評価した。試験例 1 1 と同様に安定化度を算出し、その結果を図 1 6 に示した。図 1 6 中のアミノ酸の順は、疎水親水度 (Kyte, J. & Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157, 105-132) の順である。結果は、アミノ酸類を製剤に加えることで、アミノ酸類無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の

分解を大幅に抑えることができたことを示す。

#### 試験例 1 4

##### コラーゲン含有時における糖類の遺伝子分解抑制効果

- 5 実施例 1 2 のスポンジ状の遺伝子製剤及び参考例 4 のスポンジ状の組成物を  
150mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液で加温下に溶解し、コラゲナーゼで  
処理した。処理後、試験例 1 1 に記載したようにしてアガロース電気泳動に付し  
て pCAHST-1 の一次構造を評価した。試験例 1 1 と同様に安定化度を算出し、その  
結果を図 1 7 に示した。糖類を製剤に加えることで、糖類無添加の製剤に比べて  
10 pCAHST-1 の分解を大幅に抑えることができた。

#### 試験例 1 5

##### 4 0℃保存時におけるアミノ酸類および糖類の遺伝子分解抑制効果

- 15 実施例 9 の遺伝子製剤のうちアスパラギン酸ナトリウム、グルタミン酸一ナ  
トリウム、プロリン、グルタミン処方乾燥状態の製剤と実施例 1 0 の遺伝子製剤  
のうちグルコース、シュクロース、マルトース、ラクトース、マンニトール処  
方の乾燥状態の製剤および参考例 1 の組成物を 4 0℃で 1、2、および 4 週間保  
存した。保存後の pCAHST-1 の一次構造を試験例 1 の操作に従ってアガロース電気  
泳動で評価した。得られた結果を図 1 8 に示す。結果は、非疎水性アミノ酸類あ  
るいは糖類を製剤に加えることで、無添加の製剤に比べ、かかる条件下での  
20 pCAHST-1 の保存安定性が大幅に改善されることを示している。

#### 試験例 1 6

##### 4 0℃保存時におけるコラーゲン含有遺伝子製剤に対するアミノ酸類および糖類 の遺伝子分解抑制効果

- 25 実施例 1 1 のスポンジ状の遺伝子製剤のうちリジン、グルタミン、アルギニン、  
ヒスチジン処方乾燥状態の製剤と実施例 1 2 のスポンジ状遺伝子製剤のうちグ  
ルコース、シュクロース、マルトース、ラクトース、マンニトール処方の乾燥  
状態の製剤および参考例 4 のスポンジ状の組成物を 4 0℃で 1、2、および 4 週

間保存した。保存後のpCAHST-1の一次構造を試験例13の操作に従ってアガロース電気泳動で評価した。得られた結果を図19に示す。結果は、アミノ酸類あるいは糖類を製剤に加えることで、無添加の製剤に比べ、係る条件下でのpCAHST-1の保存安定性が大幅に改善されることを示している。

5

### 発明の効果

試験例1から9にて得られた本発明製剤の遺伝子分解抑制（安定化）効果を以下の表9にまとめる。

表9

10 本発明製剤における遺伝子分解抑制効果

#### (1) 凍結乾燥時の安定性

##### ① 添加剤がない場合

a)

b)

コントロール

72%

(76%)

アミノ酸類：グリシン

79%

15

アラニン

83%

リジン

84%

アスパラギン酸

(91%)

グルタミン酸

96%

(103%)

c)

20

コントロール

78%

糖類：

グルコース

95%

シュクロース

96%

マルトース

95%

ラクトース

100%

25

マンニトール

95%

b)

コントロール

76%

有機酸類：酒石酸

95%

クエン酸

102%

## ② 添加剤がある場合：

	(コラーゲン)	d)
	コントロール	85%
	安定化剤： グルコース	94%
5	シュークロース	95%
	グルタミン酸	95%
	(DMRIE-C)	e)
	コントロール	69%
	安定化剤： シュークロース	<u>100%</u>

10 [注] a) 試験例1 (表1)、b) 試験例3 (表3)、c) 試験例2 (表2)、  
d) 試験例8 (表7)、e) 試験例4 (表4)

## (2) 凍結乾燥製剤の保存安定性

	① 添加剤がない場合：	c)	f)	f)	f)
	(40℃)	(凍乾時)	<u>1週間後</u>	<u>2週間後</u>	<u>4週間後</u>
15	コントロール	(78%)	67%	56%	34%
	安定化剤： グルコース				
		(95%)	92%	91%	71%

## ② 添加剤 (DMRIE-C) がある場合：

	(37℃)	e)	g)
	(凍乾時)		<u>4週間後</u>
20	コントロール	(69%)	8.5%
	安定化剤： シュークロース		
		<u>(100%)</u>	<u>67%</u>

[注] f) 試験例5 (表5)、g) 試験例6 (表6)

## 25 (3) ゲル化・練合わせ時の安定性

(凍乾品の練合わせによる棒状製剤形成時)

	d)	h)
	(凍乾時)	<u>棒状製剤形成後</u>
	コントロール	(85%)
		66%

安定化剤：グルコース

添加剤： コラーゲン (95%) 92%

[注] h) 試験例8 (表8)

(4) 水溶液製剤の保存安定性 1)

(40℃) 4週間後

コントロール ベクター消失

安定化剤：グルコース

添加剤：DMRIE-C ベクター残存

[注] 1) 試験例7 (図7)

#### 産業上の利用の可能性

安定性が増強された遺伝子または遺伝子を組み込んだベクターを含有する安定な遺伝子製剤は、今後利用頻度が高くなると思われる遺伝子治療に安全かつ容易に利用される。本発明製剤は、遺伝子治療が広く普及するための基盤を提供できる。特に本発明製剤は遺伝子または遺伝子を組込んだベクターを常温で流通あるいは保管することを可能とし、コールドチェーンが整備されていない地域で使用可能なDNAワクチンを提供できる。

## 請求の範囲

1. 所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターと、少なくとも1つの糖類および/または少なくとも1つの非疎水性アミノ酸類および/または少なくとも1つのカルボキシル基を2個以上有する有機酸類（アミノ酸類を除く）を含む安定な遺伝子製剤。
2. 糖類が、単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖またはそれらの糖アルコールである請求項1記載の遺伝子製剤。
3. 糖類が、グルコース、ガラクトース、フルクトース、シュクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース、ソルビトールまたはマンニトールである請求項2記載の遺伝子製剤。
4. 非疎水性アミノ酸類が、グルタミン酸、アスパラギン酸またはその塩である請求項1記載の遺伝子製剤。
5. カルボキシル基を2個以上有する有機酸類が、カルボキシル基を2個もしくは3個有する有機酸またはその塩である請求項1記載の遺伝子製剤。
6. カルボキシル基を2個もしくは3個有する有機酸が、クエン酸または酒石酸である請求項5記載の遺伝子製剤。
7. 所望の遺伝子を組み込んだベクターがプラスミドDNAである請求項1ないし6いずれかに記載の遺伝子製剤。
8. 溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態である遺伝子製剤または溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態の工程を経て製造される遺伝子製剤において、溶液状態、ゲル状態または懸濁液状態における糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類（アミノ酸類を除く）の全体に対する含有量が約1 w/v %以上である請求項1記載の遺伝子製剤。
9. 細胞への遺伝子導入を促進する物質をさらに含む請求項1ないし8いずれかに記載の遺伝子製剤。
10. 細胞への遺伝子導入を促進する物質が、カチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたは疎水性ポリマーである請求項9記載の遺伝子製剤。
11. 医学的に許容される添加剤をさらに含む請求項1ないし10記載の遺伝

子製剤。

12. 添加剤が生体親和性材料である請求項11記載の遺伝子製剤。

13. 所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターが生体親和性材料に担持されていることを特徴とする請求項12記載の遺伝子製剤。

5 14. 生体親和性材料が、コラーゲン、ゼラチンまたはそれらの混合物である請求項12または13記載の遺伝子製剤。

15. 乾燥状態にある請求項1ないし14いずれかに記載の遺伝子製剤。

10 16. 溶液状態、ゲル状態あるいは懸濁液状態である所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターを含む調製物を乾燥工程に付することにより得られる請求項1ないし15いずれかに記載の遺伝子製剤。

17. 乾燥工程が凍結乾燥である請求項16記載の遺伝子製剤。

15 18. 所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターを含む遺伝子調製物に、少なくとも1つの糖類および／または少なくとも1つの非疎水性アミノ酸類および／または少なくとも1つのカルボキシル基を2個以上有する有機酸類（アミノ酸類を除く）を添加することからなる、遺伝子製剤を安定化する方法。

19. 請求項1ないし17いずれかに記載の遺伝子製剤を生体に投与することからなる、遺伝子治療方法。

20. 所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクター、少なくとも1つのアミノ酸類、およびコラーゲンまたはゼラチンを含む安定な遺伝子製剤。

20 21. 溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態である遺伝子製剤または溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態の工程を経て製造される遺伝子製剤において、溶液状態、ゲル状態または懸濁液状態におけるアミノ酸類の全体に対する含有量が約1w/v%以上である請求項20記載の遺伝子製剤。

25 22. 細胞への遺伝子導入を促進する物質をさらに含む請求項20または21記載の遺伝子製剤。

23. 細胞への遺伝子導入を促進する物質が、カチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたは疎水性ポリマーである請求項22記載の遺伝子製剤。

24. 所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターがコラーゲンあるいはゼラチンに担持されていることを特徴とする請求項20ないし23いずれ

かに記載の遺伝子製剤。

25. 乾燥状態にある請求項20ないし24いずれかに記載の遺伝子製剤。

26. 溶液状態、ゲル状態あるいは懸濁液状態である所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターを含む調製物を乾燥状態に付することにより得ら

5 れる請求項20ないし25いずれかに記載の遺伝子製剤。

27. 乾燥工程が凍結乾燥である請求項26記載の遺伝子製剤。

28. 所望の遺伝子または所望の遺伝子を組み込んだベクターとコラーゲンまたはゼラチンとを含む遺伝子調製物に、少なくとも1つのアミノ酸類を添加することからなる、遺伝子製剤を安定化する方法。

10 29. 請求項20ないし27いずれかに記載の遺伝子製剤を生体に投与することからなる、遺伝子治療方法。



図 1

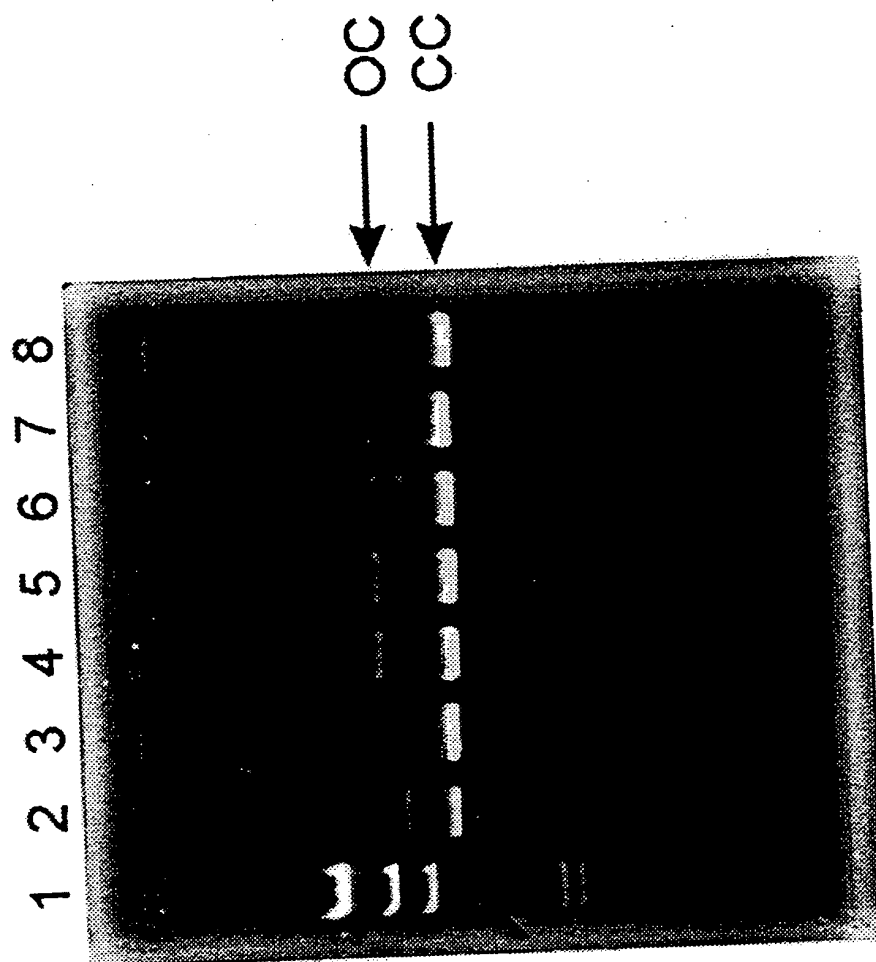
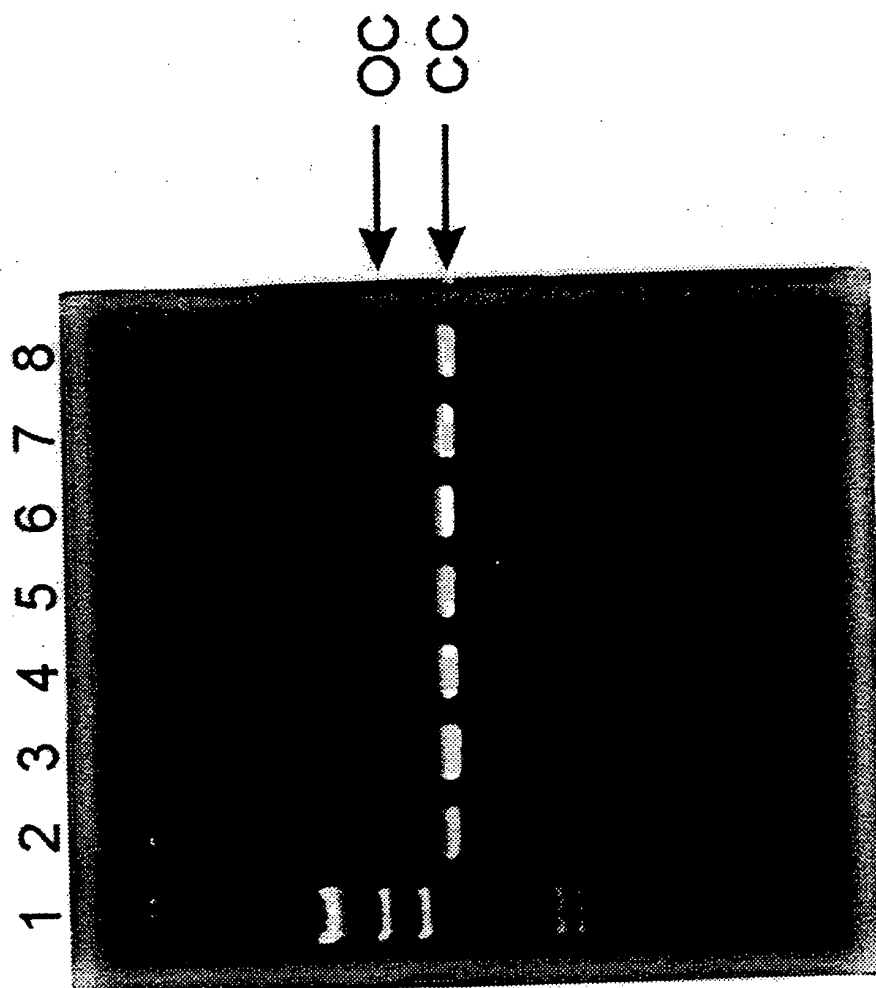


図 2



3/19

図 3

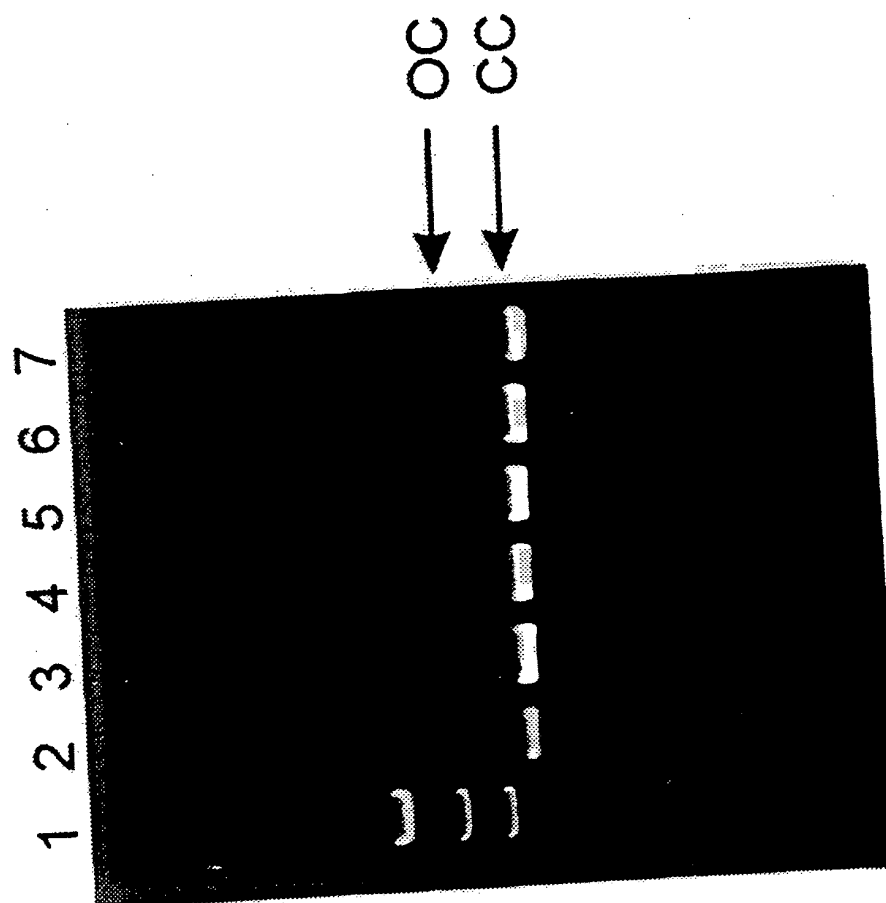


図 4

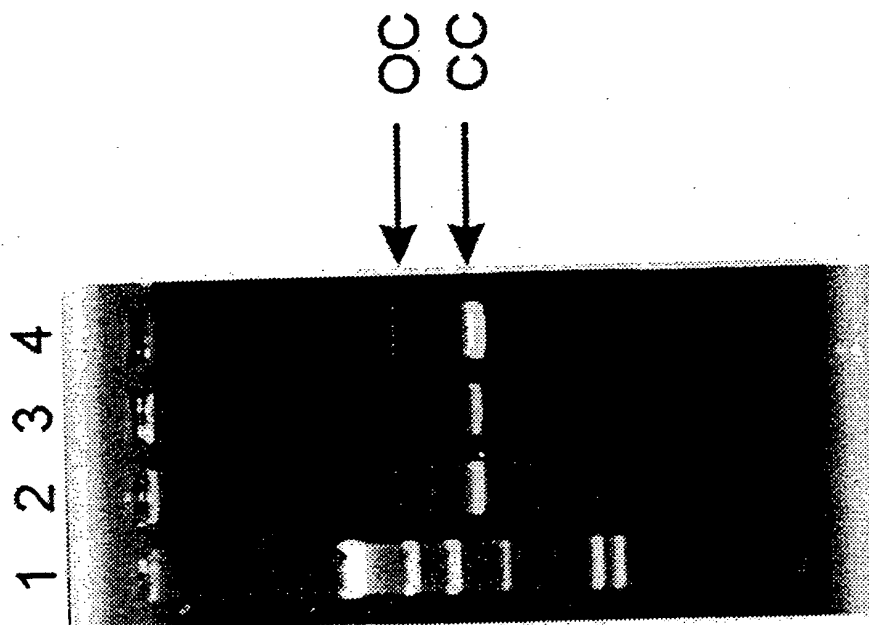




図 6

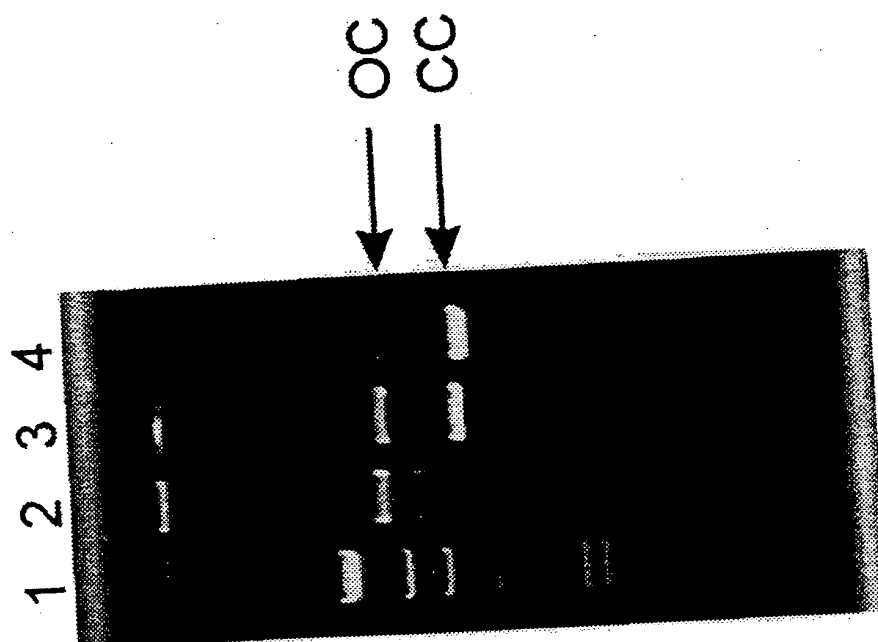


図 7

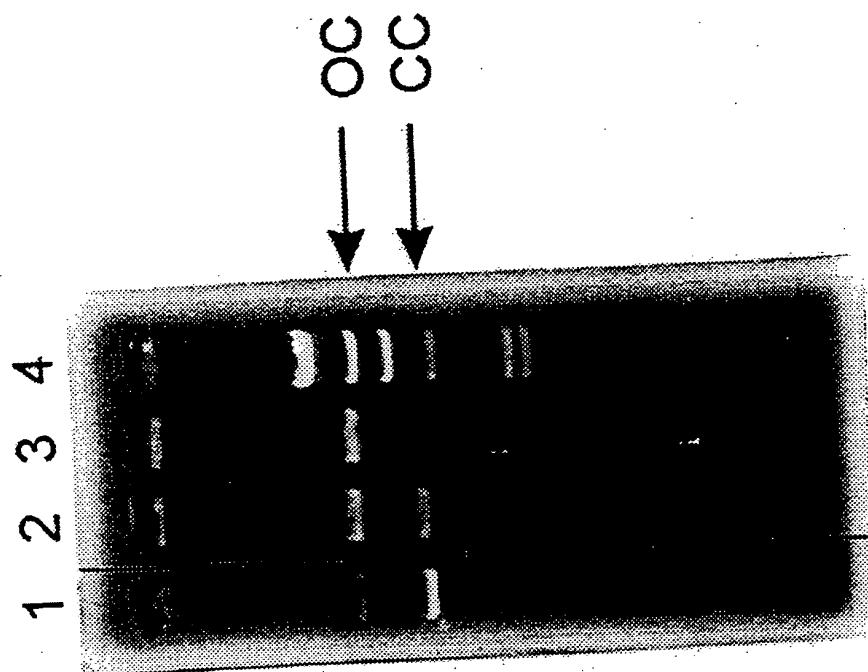


図 8

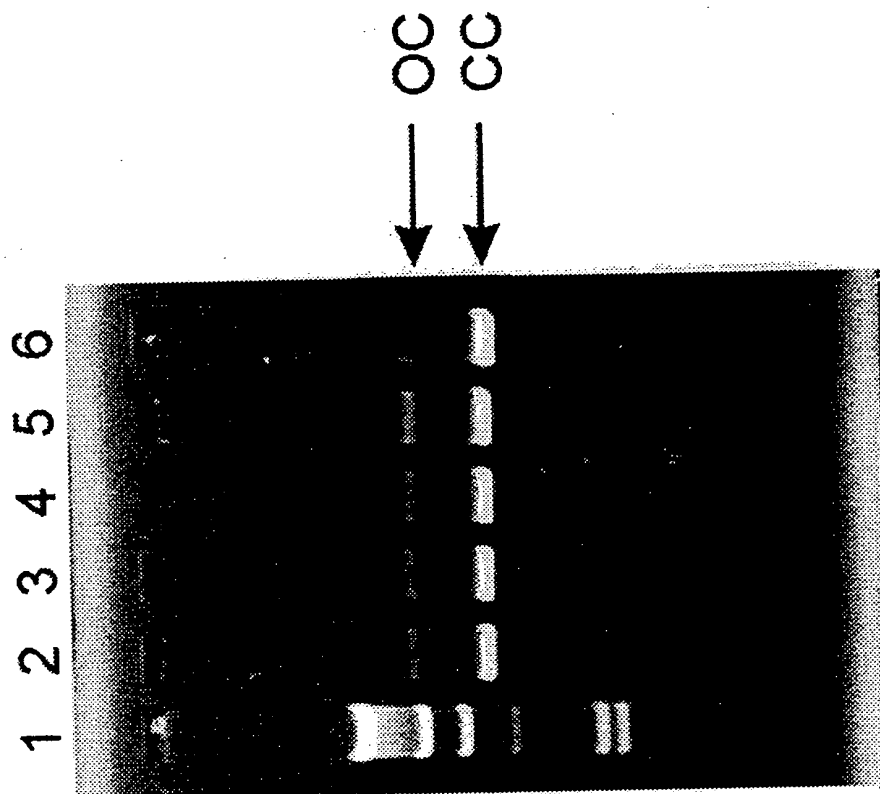
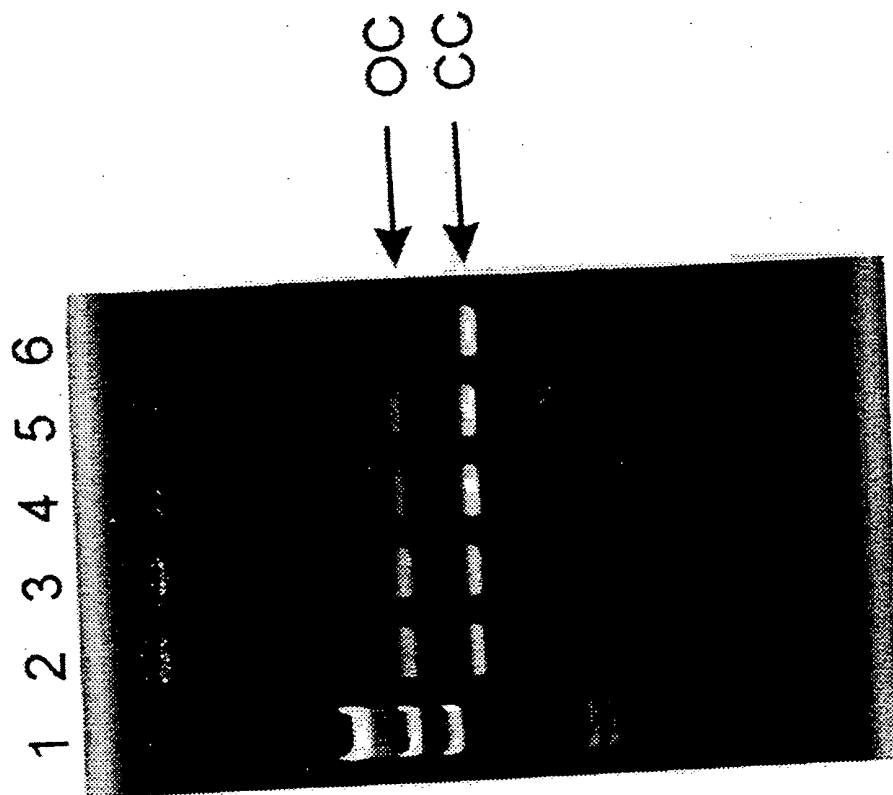


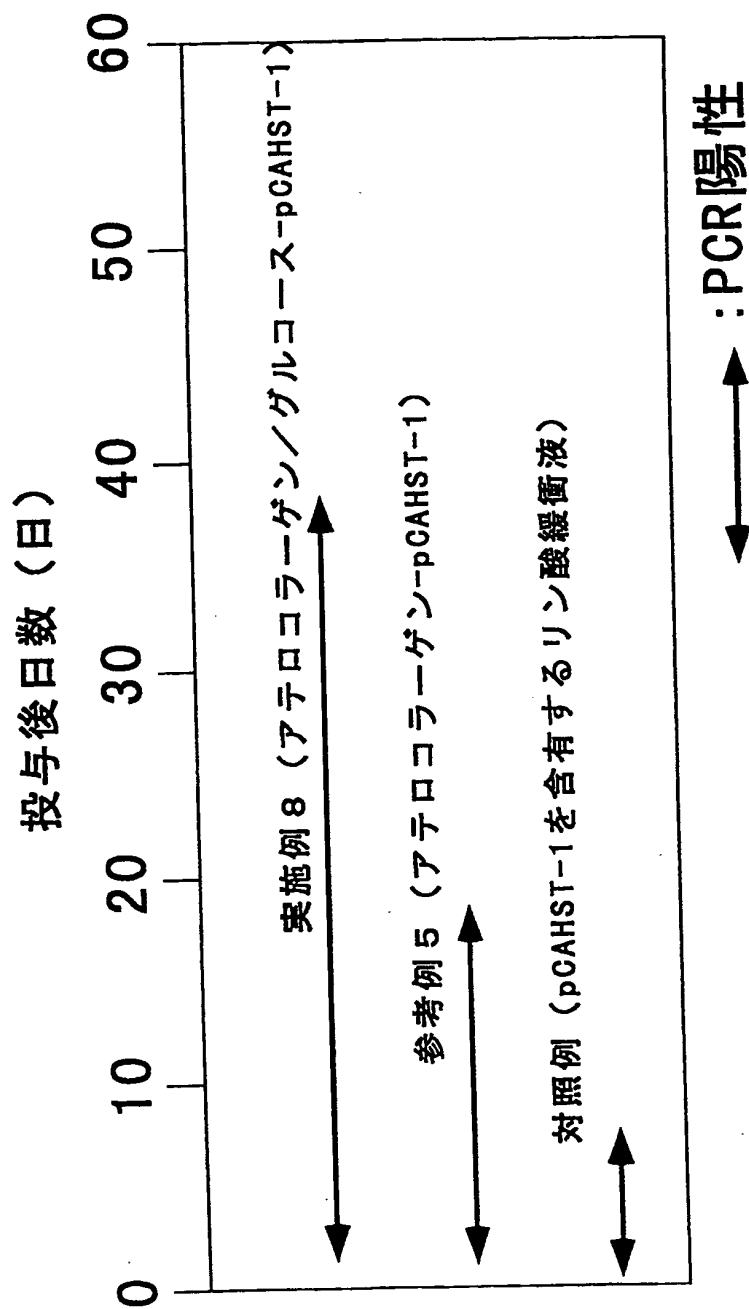


図 9



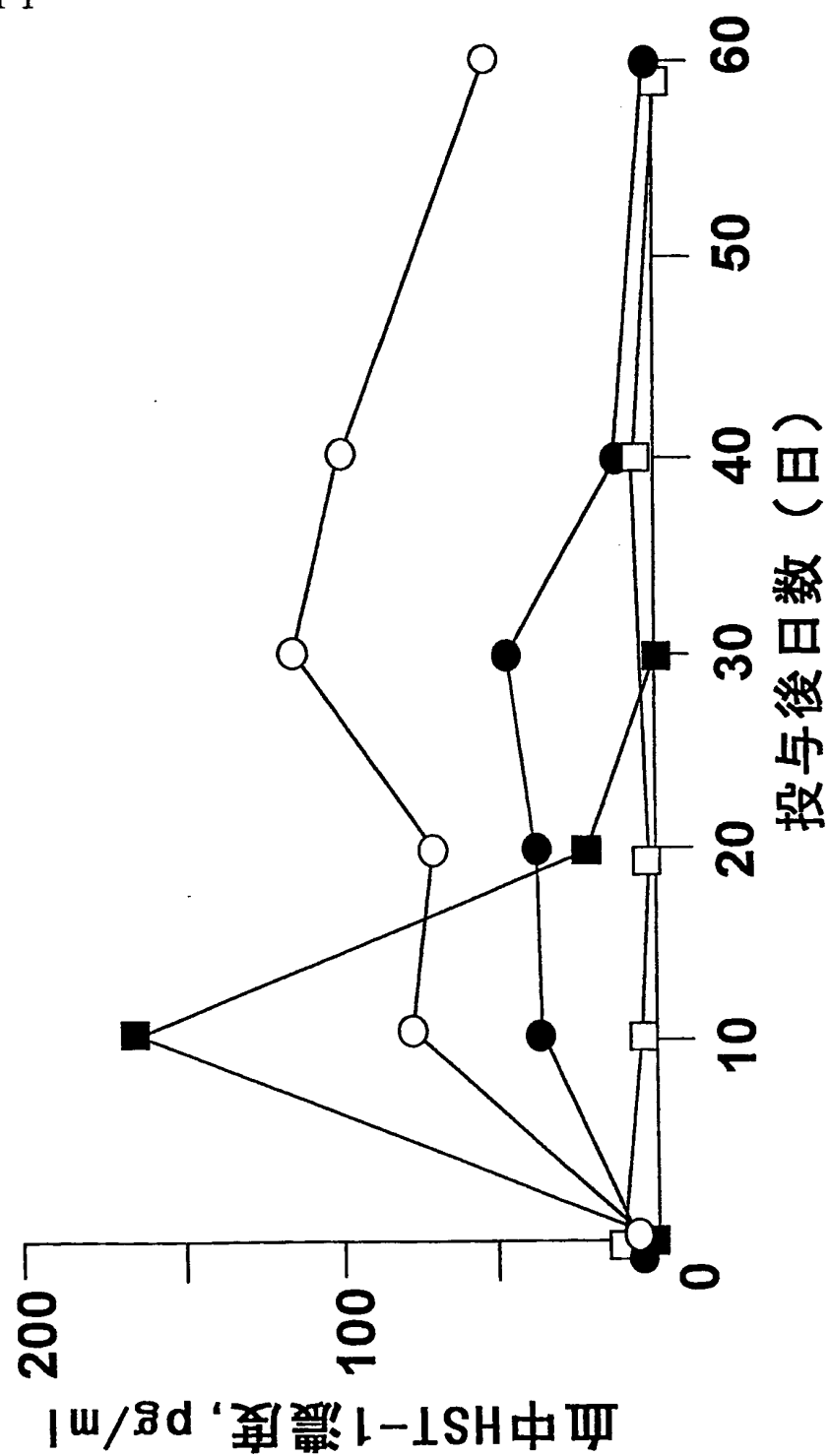
10/19

図 10



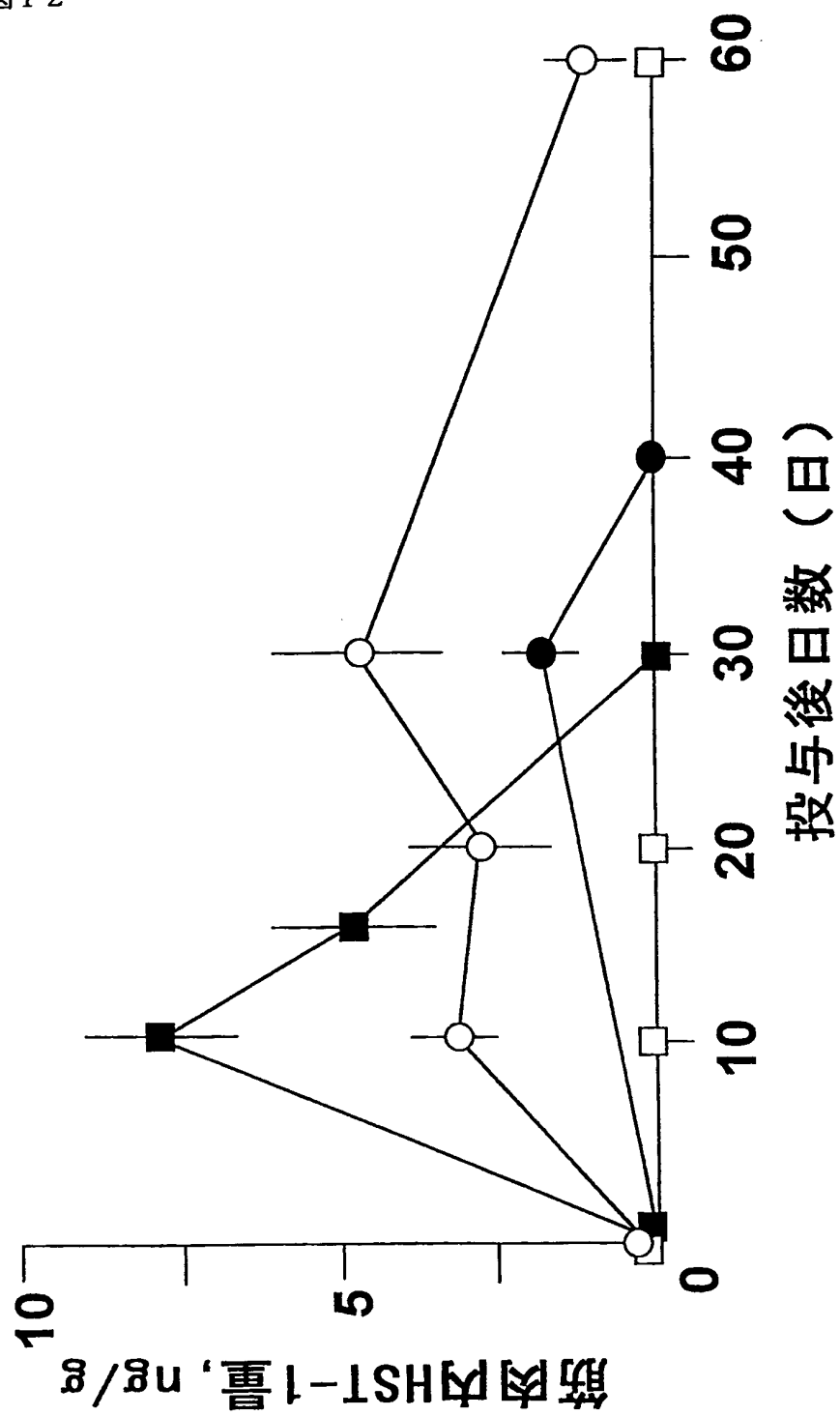
11/19

図 11



12/19

図 12



13/19

図 13

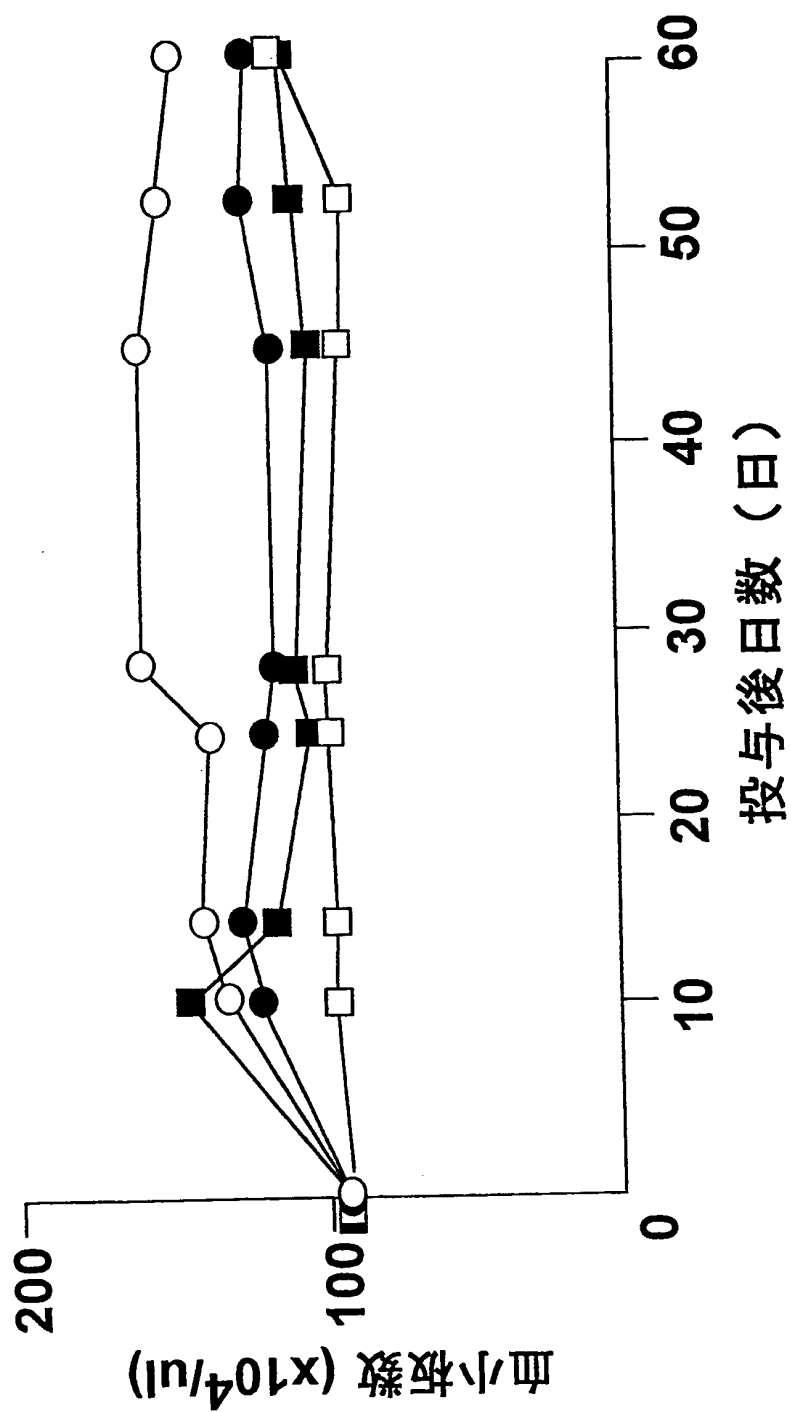


図 14

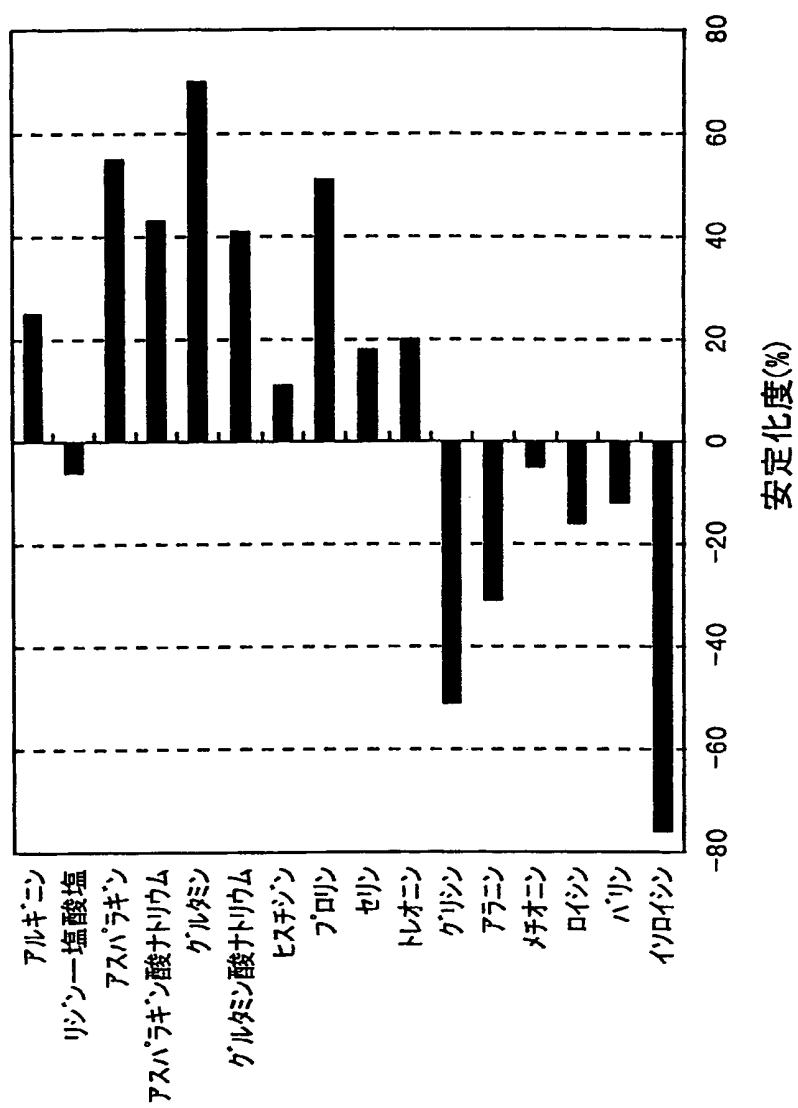


図 15

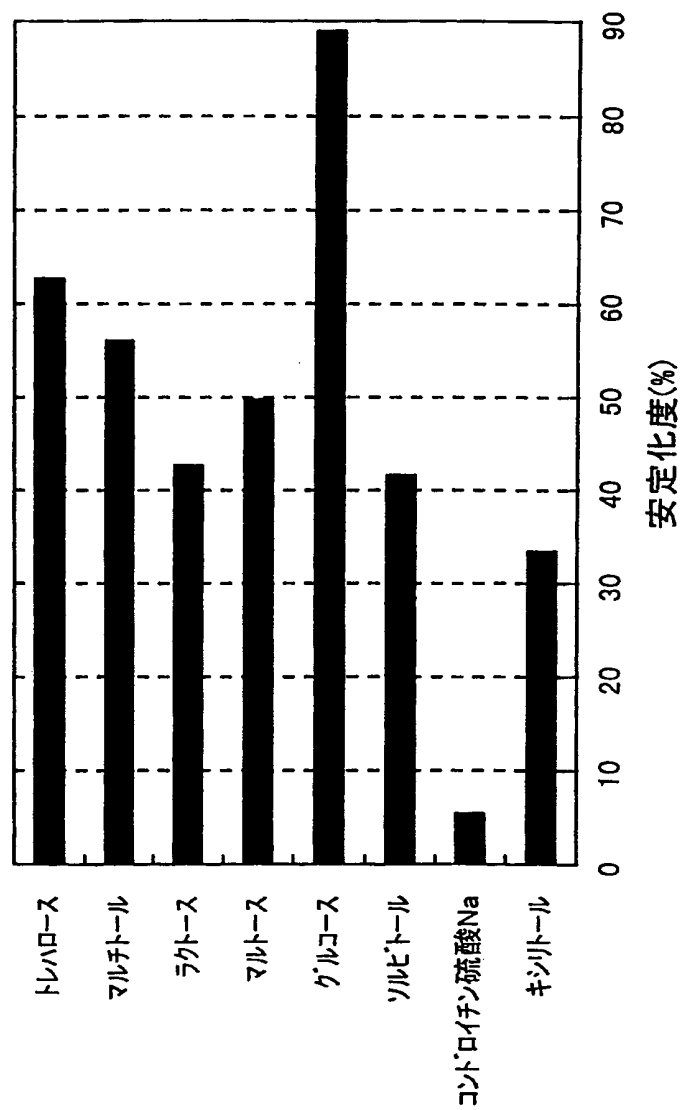


図 16

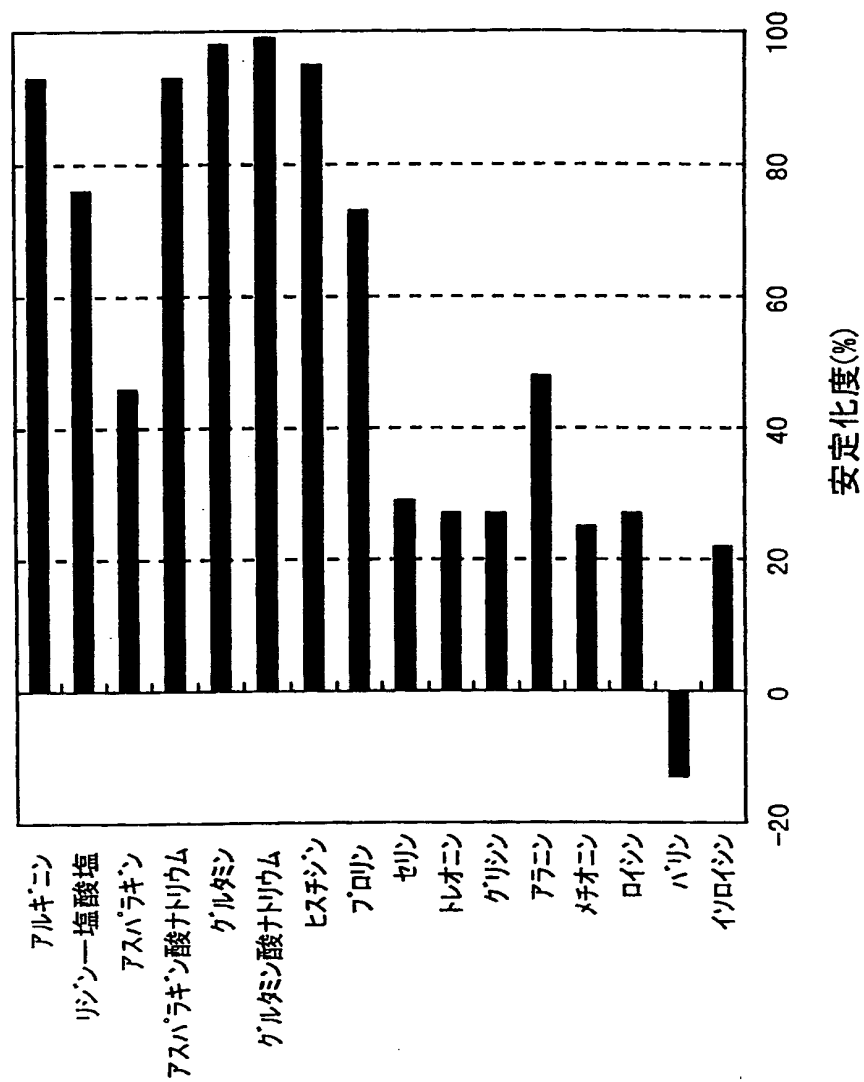




図17

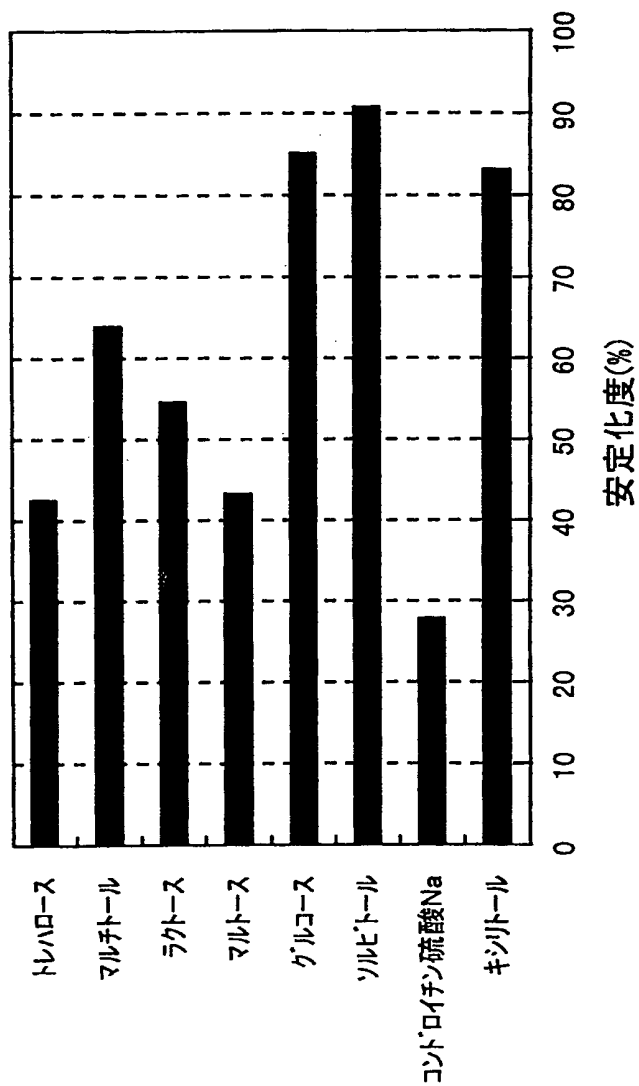
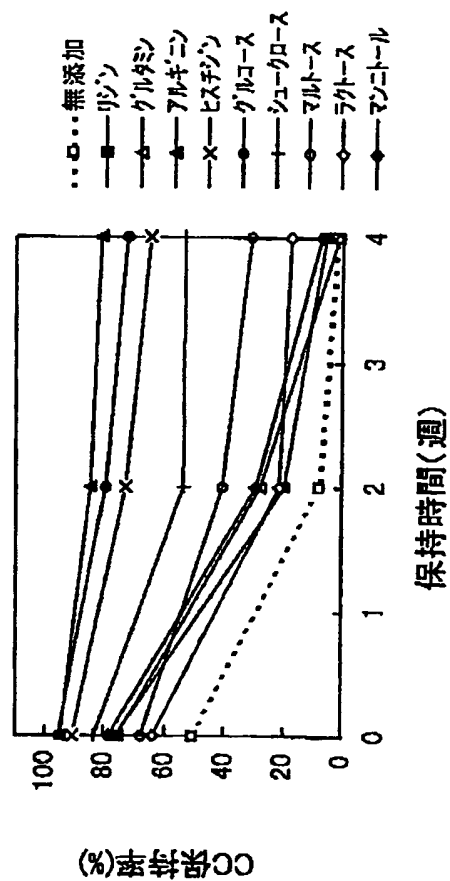




图 19



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02595

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 9-71542, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 18 March, 1997 (18. 03. 97) Par. Nos. [0009] to [0014], [0019], [0020] & WO, 972047, A & CA, 2225998, A & AU, 704694, B & EP, 844004, A	1-3, 7, 9-18, 20, 22-28
Y		8, 21
A		4-6
X	WO, 9640265, A (Regents of the University of California), 19 December, 1996 (19. 12. 96), Full text & CA, 2223921, A & AU, 9659381, A & EP, 833667, A	1-3, 7-8, 15-18
Y		9-14, 20-28
A		4-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 16 July, 1999 (16. 07. 99)	Date of mailing of the international search report 27 July, 1999 (27. 07. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02595

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 19, 29  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 19 and 29 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/02595

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl.<sup>8</sup> A61K48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl.<sup>8</sup> A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-1999年  
日本国登録実用新案公報 1994-1999年  
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 9-71542, A (住友製薬株式会社 外1名) 18. 3月. 1997 (18. 03. 97) 段落番号【0009】～【0014】【0019】【0020】 & WO, 9702047, A & CA, 2225998, A & AU, 704694, B & EP, 844004, A	1-3, 7, 9-18, 20, 22-28
Y A		8, 21 4-6
X	WO, 9640265, A (Regents of the University of California) 19. 12月. 1996 (19. 12. 96) 全文	1-3, 7-8, 15-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 07. 99

国際調査報告の発送日

27.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子

4 C

9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	& CA 2223921, A & AU, 9659381, A & EP 833667, A	9-14, 20-28
A		4-6

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 19, 29 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲19, 29は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。